

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCIO DOS SANTOS VASCONCELOS

OBTENÇÃO DE VANILINA POR VIA MICROBIANA

CURITIBA

2014

MARCIO DOS SANTOS VASCONCELOS

OBTENÇÃO DE VANILINA POR VIA MICROBIANA

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Adriane B. P. Medeiros.

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

À todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof. Dra. Adriane pela dedicação, paciência e compreensão;

À Dra. Cristine por suas contribuições na parte analítica;

Aos colegas Maria Rosa, Mara, Mitiyo, Denise, Michelle Tanoue e Fernanda Vasconcellos pelo companheirismo e apoio nas horas de dificuldades.

Em especial

Aos meus pais pelo incentivo e suporte nas dificuldades da vida;

À minha esposa Kelly pelo apoio, carinho e compreensão;

À minha filha Isabella, por renovar minhas forças e trazer alegria em todas as horas.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a determinação das melhores condições para o desenvolvimento de um processo viável de produção biotecnológica de vanilina a partir de fermentação por microrganismos. Foram testados protocolos para estabelecimento do cultivo de tecidos e células de *Vanilla planifolia* a serem utilizadas nos cocultivos com as cepas bacterianas. Um dos protocolos testados para o cultivo de tecidos foi apropriado para a germinação das plantas e estabelecimento da cultura vegetal, porém para o estabelecimento da cultura de células ainda não foi possível ajustar um protocolo viável. Para análise da tolerância das bactérias aos compostos, as cepas foram cultivadas em meio contendo diferentes concentrações dos mesmos e a biomassa foi determinada por densidade óptica. Para os estudos da produção de vanilina foi feito um DCCR e as amostras dos experimentos foram analisadas em HPLC e utilizadas para o desenvolvimento de um método colorimétrico para detecção de vanilina. Com relação à tolerância dos compostos testados *Amycolatopsis orientalis* foi capaz de crescer em concentrações de 1,0 a 5,0 g/L de isoeugenol e não foi capaz de crescer no meio com vanilina a 5,0 g/L. *Bacillus subtilis* MLPB cresceu apenas na presença de isoeugenol a 2,0 e 5,0 g/L e vanilina 0,5 g/L. Três cepas isoladas, M1, M2 e M3, cresceram com isoeugenol e apresentaram crescimento para a vanilina inclusive na concentração de 5 g/L e para o ácido ferúlico e eugenol. Considerando a capacidade de produção de vanilina para *A. orientalis* e *B. subtilis* a taxa de inóculo não foi um fator significativo na determinação das variáveis testadas e o melhor tempo para a adição dos precursores foi estabelecido em 12 horas após o início da fermentação. *Amycolatopsis orientalis* apresentou a melhor produção média utilizando eugenol como precursor com acúmulo de 46,02 mg/L de vanilina em meio contendo 0,3 g/l de precursor adicionado após 36 horas do início do cultivo, 7% de inóculo e 15 g/L de glicose, inclusive com melhor taxa de bioconversão 15,34%. *Bacillus subtilis* MLPB utilizando o isoeugenol como precursor a 10 g/L alcançou uma produção média de 214,56 mg/L \pm 6,84 de vanilina com uma taxa de bioconversão de 2,22 %. As cepas M1, M2 e M3 foram capazes de bioconverter todos os precursores estudados neste trabalho, porém os melhores valores foram para o isoeugenol nos três casos. O máximo de produção de vanilina foi de 125,66 mg/L para a cepa M1 e taxa de bioconversão de 1,22 %; 372,90 mg/L e bioconversão de 3,61 % para M2 e 262,61 mg/L e bioconversão de 2,57 % para M3. Os resultados obtidos nas fermentações feitas com 1 a 10 g/L de isoeugenol com a cepa M2 mostraram maior produção (596,88 mg/L) de vanilina com a maior concentração do precursor (10 g/L), melhor eficiência molar foi obtida com a concentração de 1g/L de isoeugenol (15,69%) e a melhor viabilidade econômica foi verificada com a utilização de 5,5 g/L de isoeugenol, a qual apresentou saldo líquido de R\$ 0,66 por litro de fermentado.

PALAVRAS-CHAVE: Vanilina, Processos Biotecnológicos, Biotecnologia.

ABSTRACT

This study aimed to identify the best conditions for the development of a viable process of biotechnological production of vanillin from fermentation by microorganisms. Protocols were tested for tissue culture is established and *Vanilla planifolia* cells to be used in cocultures with bacterial strains. One of the protocols tested for tissue culture was suitable for plant emergence and establishment of plant culture, but to the cell culture establishment has not yet been possible to set a viable protocol. For analysis of bacterial tolerance to the compounds of the strains were cultured in medium containing different concentrations of the same and the biomass was determined by optical density. For the production of vanillin was made a CCRD studies and experiments samples were analyzed on HPLC and used for the development of a colorimetric detection method for vanillin. With regard to tolerance of *Amycolatopsis orientalis* compounds tested was able to grow at concentrations of 1.0 to 5.0 g / L of isoeugenol and was not able to grow in medium with vanillin 5.0 g / L. *Bacillus subtilis* MLPB grew only in the presence of isoeugenol and 5.0 to 2.0 g / l vanillin and 0.5 g / L. Three strains, M1, M2 and M3, grew up with isoeugenol and grew to vanillin including the concentration of 5 g / L and ferulic acid and eugenol. Whereas vanillin production capacity for *A. orientalis* and *B. subtilis* inoculum rate was not a significant factor in determining the variables tested and the best time for addition of the precursors was set at 12 hours after initiation of fermentation. *Amycolatopsis orientalis* had the best average production using eugenol as a precursor with accumulation of 46.02 mg / L vanillin in medium containing 0.3 g / l precursor added after 36 hours of initial plating 7% inoculum and 15 g / L glucose, including better bioconversion 15.34%. using *Bacillus subtilis* MLPB as a precursor isoeugenol to 10 g / L reached an average production of 214.56 mg / L \pm 6.84 with a bioconversion of vanillin 2.22%. The strains M1, M2 and M3 were able to bioconvert all precursors studied in this work, but the best values were isoeugenol for the three cases. The maximum vanillin production was 125.66 mg / L to M1 and bioconversion strain of 1.22%; 372.90 mg / L and 3.61% for bioconversion M2 and 262.61 mg / L and 2.57% for bioconversion M3. The results of the fermentations carried out with 1 to 10 g / L M2 with isoeugenol strain showed higher production (596.88 mg / L) of vanillin with the highest concentration of the precursor (10 g / L) molar better efficiency was obtained with the concentration of 1 g / L of isoeugenol (15.69%) and higher profitability was verified with the use of 5.5 g / L of isoeugenol, which had a net balance of R \$ 0.66 per liter of fermented.

KEY WORDS: Vanillin, Biotechnological Processes, Biotechnology

SUMÁRIO

Introdução.....	1
Capítulo 1.....	4
Revisão da literatura.....	4
Aromas.....	4
2 Produção de vanilina por <i>Vanilla</i>	4
2.1 Considerações gerais.....	6
2.1.1 Cultivo de células, tecidos e órgãos de <i>Vanilla</i>	9
2.1.2 Processo produtivo.....	9
3 Produção de vanilina por via microbiana.....	11
3.1 Cultivos.....	11
3.2 Metabolismo microbiano.....	12
3.3 Principais de microrganismos utilizados em processos biotecnológicos de produção de vanilina.....	15
3.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	16
3.3.2 <i>Amycolatopsis orientalis</i>	16
3.4 Precursores mais utilizados nos processos de produção de vanilina por fermentação microbiana.....	16
3.5 Processos.....	18
4 Análises da produção de vanilina.....	19
Referências.....	20
Capítulo 2.....	26
Cultivo de tecido e células de <i>Vanilla planifolia</i>	26
1 Introdução.....	26
2 Materiais e métodos.....	28
2.1 Cultivo de tecido vegetal.....	28
2.2 Produção de calos.....	31
3 Resultados.....	32
3.1 Cultivo de tecido vegetal.....	32
3.2 Produção de calos.....	34
4 Conclusões.....	37
Referências.....	38

Capítulo 3.....	40
Desenvolvimento de um método espectrofotométrico para detecção de vanilina.....	40
1 Introdução.....	40
2 Materiais e métodos.....	42
2.1 Soluções.....	42
2.1.1 Preparo das soluções.....	42
2.2 Análise.....	43
2.2.1 Leitura em espectrofotômetro.....	43
2.2.2 Análise em HPLC.....	44
2.2.3 Correlação espectrofotômetro x HPLC.....	44
3 Análise dos resultados.....	45
3.1 Método colorimétrico para detecção de vanilina.....	45
3.1.1 Determinação das condições de análise.....	45
3.1.2 Correlações absorbâncias x áreas de picos do HPLC.....	47
3.1.3 Interferentes.....	51
4 Conclusões.....	52
Referências.....	52
Capítulo 4.....	56
Produção de vanilina por microrganismos isolados.....	56
1 Introdução.....	56
2 Materiais e métodos.....	58
2.1 Microrganismos.....	58
2.1.1 Isolamento de microrganismos.....	58
2.1.2 Isolamento de microrganismos da superfície da semente de <i>Dipteryx odorata</i> (cumaru).....	59
2.1.3 Aquisição da cepa <i>amycolatopsis orientalis</i>	60
2.2 Identificação molecular das cepas isoladas do meio de cultivo de <i>vanilla planifolia</i>	60

2.2.1 Amplificação da região 16s rDNA.....	61
2.2.2 Purificação de DNA para reação de sequenciamento.....	62
2.2.3 Sequenciamento de DNA.....	62
2.3 Meios para cultivo microbiano.....	63
2.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	63
2.3.2 Cultivo das cepas isoladas.....	63
2.4 Otimização do meio de cultivo de <i>B. Subtilis</i>	63
2.5 Curva de crescimento e preparo de inoculo.....	65
2.6 Teste de tolerância à vanilina e precursores em meio líquido.....	65
2.6.1 Preparo das soluções.....	65
2.7 Produção de vanilina.....	66
2.7.1 Estudo 1: DCCR para <i>B. Subtilis</i> e <i>A. Orientalis</i>	67
2.7.2 Estudo 2: repetições das melhores condições do estudo 1.....	67
2.7.3 Estudo 3: DCCR para <i>B. Subtilis</i> , <i>A. Orientalis</i> , M1, M2 e M3.....	68
2.7.4 Estudo 4: DCCR para a cepa M2 com maiores concentrações do precursor.....	68
2.8 Análise da vanilina e análise estatística.....	69
3 Análises dos resultados.....	70
3.1 Identificação da cepa.....	70
3.2 Determinação da composição do meio de cultura.....	70
3.3 Seleção e isolamento das cepas de <i>D. Odorata</i>	72
3.4 Testes de tolerância em meio líquido.....	74
3.4.1 <i>Amycolatopsis orientalis</i>	74
3.4.2 <i>Bacillus subtilis</i>	75
3.4.3 M1, M2 e M3.....	76
3.5 Produção de vanilina.....	80
3.5.1 Bioconversão por <i>Amycolatopsis orientalis</i>	80
3.5.2 Repetições dos ensaios do DCCR.....	82
3.5.3 Segundo planejamento para produção de vanilina.....	83
3.5.3.1 Estudos das condições para a bioconversão de ácido ferúlico a vanilina por <i>A. orientalis</i>	83
3.5.3.2 Estudos das condições para a bioconversão de eugenol a vanilina por <i>A. orientalis</i>	84

3.5.3.3 Estudos das condições para a bioconversão de isoeugenol a vanilina por <i>A. orientalis</i>	86
3.6 Bioconversão dos precursores.....	86
3.6.1 Bioconversão de ácido ferúlico por <i>A. orientalis</i>	86
3.6.2 Bioconversão de eugenol por <i>A. orientalis</i>	87
3.6.3 Bioconversão de isoeugenol por <i>A. orientalis</i>	87
3.6.4 Produção de vanilina e bioconversão de isoeugenol na concentração de 10 g/l por <i>A. orientalis</i>	89
3.7 Bioconversão dos precursores por <i>B. subtilis</i>	90
3.7.1 Produção de vanilina a partir de ácido ferúlico por <i>Bacillus subtilis</i> MLPB.....	90
3.7.2 Produção de vanilina a partir de eugenol por <i>Bacillus subtilis</i> MLPB.....	91
3.7.3 Produção de vanilina e taxa de bioconversão dos precursores na concentração de 10 g/l por <i>Bacillus subtilis</i> MLPB.....	91
3.8 Bioconversão dos precursores pelas cepas isoladas M1, M2 e M3.....	93
3.8.1 Produção de vanilina e taxa de bioconversão dos precursores na concentração de 10 g/l pelas cepas M1, M2 e M3.....	93
3.9 Otimização do processo de produção de vanilina e bioconversão do isoeugenol em concentrações de 1 a 10 g/l pela cepa isolada M2.....	95
4 Conclusões.....	98
Referências.....	102

INTRODUÇÃO

A vanilina é um dos aromas mais utilizados em alimentos no mundo, além da sua utilização em produtos farmacêuticos (Daugusch e Pastore, 2005).

De acordo com as regras da IUPAC sua denominação é 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído e popularmente conhecida como baunilha. A vanilina é um composto cristalino de cor branca com boa solubilidade em clorofórmio e éter. Sua massa molar é de 152,14 g.mol e possui a fórmula química $(\text{CH}_3\text{O})(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3\text{CHO}$.

A vanilina é uma molécula originalmente produzida por orquídeas do genero *Vanilla* sendo que a mais comum é a *Vanilla planifolia*. Mais precisamente a vanilina é produzida na vagem ou fava da *Vanilla* (Walton, Mayer e Narbad, 2003). Este gênero foi publicado pela primeira vez em 1754 por Miller em seu *Gardener Dicitonary*, seguindo o sistema de *Linneus* onde recebeu o nome de *Vanilla* (Pacheco e Damasio, 2010).

A vanilina já era extraída pelos astecas antes da chegada do espanhol Hernán Cortes, em 1519, o qual a introduziu como produto de importância financeira na Europa Courter e Burreson¹ (2006 citados por Pacheco e Damasio, 2010). A fonte original da vanilina, plantas do gênero *Vanilla*, passou a ser cultivada em vários países tropicais do mundo, sendo que o México, Madagascar, Taiti e Indonésia, são os principais produtores (Walton, Mayer e Narbad, 2003).

O problema é que o rendimento em vanilina é 2% do peso das favas secas de vanilla e, desta forma, toda a produção de vanilina natural do mundo representa 0,16% da baunilha consumida, ou seja, aproximadamente 20 toneladas de vanilina natural produzidas para 12000 toneladas consumidas (Pacheco e Damasio, 2010).

Uma comparação do preço da vanilina natural com a sintética, para a indústria, mostrou que o preço da vanilina natural é muito superior ao da sintética. Os autores chamam à atenção para este fato aliado ao baixo rendimento da vanilina extraída da planta ser o motivo do grande interesse nos estudos de novas alternativas para

¹ Courter, P. L.; Burreson, J. **Os botões de Napoleão: As 17 moléculas que mudaram a história**. Rio de Janeiro, Jorge Zahar, 2006.

produção de baunilha natural por processos biotecnológicos (Daugusch e Pastore, 2005; Pacheco e Damasio, 2010; Rodrigues, 2012).

As pesquisas para encontrar diferentes formas de produção de vanilina considerada natural e o estudo dos fatores implicados nesta produção, vêm sendo realizadas há tempos, tanto através do cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais Kalimuthu *et al.* (2006) (*Vanilla planifolia*), quanto com microrganismos Gurujeyalakshmi & Mahadevan (1987) (*Bacillus subtilis*), Gioia *et al.* (2011) (*Pseudomonas fluorescens* BF13), Ma e Daugulis (2014) (*Amycolatopsis sp.* ATCC 39116).

A investigação do processo de bioconversão de precursores como eugenol, ácido ferúlico e isoeugenol em vanilina utilizando culturas microbianas tem resultado em uma diversidade de propostas para tentar aumentar a produtividade e desenvolver um processo economicamente viável. As alternativas vão desde isolamento e seleção de cepas selvagens até a mutação e construção de cepas geneticamente melhoradas (LI *et al.*, 2008; OVERHAGE *et al.*, 2006).

Entre as vantagens apontadas pelas companhias, para a produção por processos biotecnológicos uma é a possibilita obter aromas com perfis mais balanceados, com novas e específicas características, que não são conseguidas nos processos tradicionais. Elas também apontam o fato de que o consumidor tende a procurar alimentos mais saudáveis, com o máximo de características naturais como outra vantagem. Outra vantagem é a possibilidade de utilização de subprodutos agroindustriais nas fermentações microbianas para produção de aromas, os quais normalmente seriam descartados gerando uma considerável quantidade de resíduos no ambiente (Santos, 2009; Medeiros, et al., 2000; Medeiros et al., 2006).

O mercado de aromas e sabores movimentou 11,2 bilhões de dólares em 2012 e há uma projeção de crescimento até 2017 para 14,5 bilhões de dólares. O mercado brasileiro para aromas e sabores foi de 500 milhões de dólares em 2012 e há uma projeção de crescimento anual de 6,1% até 2022. Um dos fatores que também está contribuindo para o aumento deste mercado, é a necessidade do consumo dos produtos processados em grandes centros urbanos e necessitam de alimentos que exigem pouco tempo de preparo. Dentre estes aromas está a vanilina um composto muito utilizado na indústria de alimentos e bebidas. O Brasil não possui produção

desta molécula e necessita importar anualmente 550 t equivalente a 8,5 milhões de dólares (Bain & Company e Gas Energy, 2014).

O interesse na produção de vanilina através de meios alternativos e através do cultivo da *Vanilla* não é muito recente. Pacheco e Damasio (2010) datam as primeiras experiências para produção de vanilina sintética a partir do eugenol nos anos de 1874-1875. (Walton, Mayer e Narbad, 2003).

Este trabalho teve como objetivo a determinação das melhores condições para o desenvolvimento de um processo viável de produção biotecnológica de vanilina a partir de fermentação por microrganismos a partir do Estabelecimento de uma cultura *in vitro* de *Vanilla planifolia*, Produção de calos, para estabelecer o cultivo de células vegetais, Cultivo de células vegetais em suspensão para co-cultivo com células microbianas na presença do precursor ácido ferúlico, Isolamento e seleção de microrganismos tolerantes à vanilina, Estudo das condições de cultivos de microrganismos para a produção de vanilina e desenvolvimento de um método espectrofotométrico para rastrear a presença de vanilina em fermentados durante os estudos de sua produção.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

AROMAS

A complexidade dos aromas é notória, sendo que alguns podem conter até mil moléculas diferentes atuando para conferir um aroma característico e os aromas podem ser classificados em naturais, sintéticos e bioaromas. No primeiro caso são considerados aqueles obtidos diretamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos a partir de matérias-primas aromatizantes naturais. Já os aromas sintéticos podem ser divididos em idênticos aos naturais e artificiais. No caso dos idênticos aos naturais eles apresentam estrutura química idêntica as dos aromas naturais e podem ser obtidos por processos químicos definidos ou isolados quimicamente de fontes animal ou vegetal. Os artificiais são compostos quimicamente definidos produzidos por síntese química e que ainda não foram encontrados em materiais de origem animal ou vegetal na sua forma primária o processado para utilização humana. Os bioaromas por sua vez, são aqueles obtidos por fermentações microbianas sendo que existem mais de 3000 microrganismos utilizados para a sua produção.

Funk e Brodelius (1992) cultivaram células de *Vanilla planifolia* em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) a fim de encontrar um elicitador capaz de estimular as células a produzirem mais ácido vanílico, e desta forma, fornecer material para o estudo das enzimas envolvidas na biossíntese dos derivados de benzoatos. A partir de seus resultados os autores puderam propor uma possível via de síntese de ácido vanílico nas células de *Vanilla* como segue: fenilalanina, ácido cinâmico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido isoferulico, ácido 3,4-dimetoxicinamico, ácido 3,4-dimetoxibenzoico e ácido vanílico.

Podstolski *et al.* (2002) estudaram a atividade da enzima 4-hidroxibenzaldeído sintase produtora de 4-hidroxibenzaldeído a partir de ácido 4-cumarico, em cultura de células de *Vanilla planifolia* e concluíram que a planta pode apresentar naturalmente

uma via de conversão não-oxidativa de ácido 4-cumarico a 4-hidroxibenzaldeído como alternativa à via oxidativa.

Sinha, Verma e Sharna (2007) utilizaram vanilina extraída de favas de *Vanilla planifolia* Andrews para o trabalho de validação de um método de RP-HPLC para análise de vanilina. Estes pesquisadores conseguiram estabelecer condições de análise com boa precisão, resolução e rapidez.

Gasson *et al.* (1998) estudaram a biotransformação de ácido ferúlico a vanilina por *Pseudomonas fluorescens* biovar V, linhagem AN103. Puderam também estabelecer uma possível rota de síntese de vanilina por esta cepa microbiana utilizando ácido ferúlico como precursor (Figura 1.1).

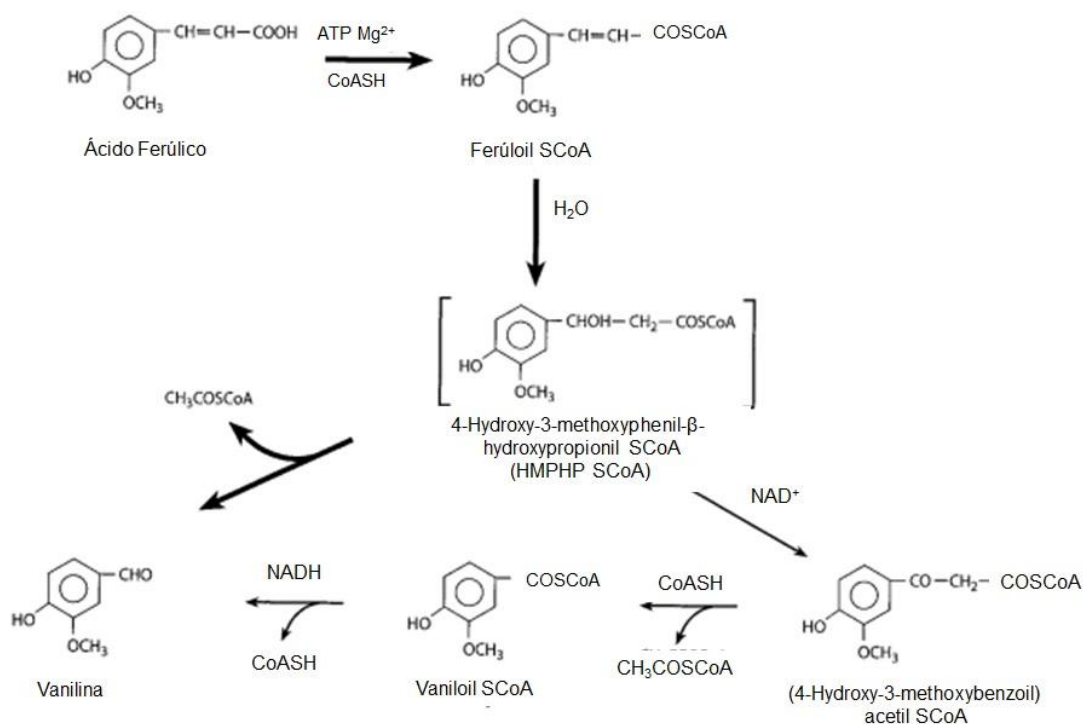


Figura 1.1 – Via de conversão de ácido ferúlico a vanilina com rota estabelecida para a β -oxidação mostrada por setas mais finas e a rota não estabelecida para *P. fluorescens* biovar V, linhagem AN103, estão representadas pelas setas mais grossas (GASSON, et. al. 1998).

Li *et al.* (2008) isolaram uma bactéria endofítica *Enterobacter sp.* Px6-4 e propuseram uma via metabólica de formação de vanilina por via 4-vinilguaicol. Os resultados apresentaram duas novas vias que levavam a produção de outros compostos com o carbono marcado que usaram e desta forma não houve formação significativa de vanilina pela cepa.

Ashengroph *et al.* (2011) isolaram uma cepa de *Pseudomonas resinovorans* SPR1 e analisaram sua capacidade de transformar eugenol em vanilina. Eles conseguiram rendimentos razoáveis e uma concentração máxima de vanilina de 240 mg/L sem qualquer otimização do processo. Propuseram ainda, uma possível via de bioconversão de eugenol a vanilina (Figura 1.2)

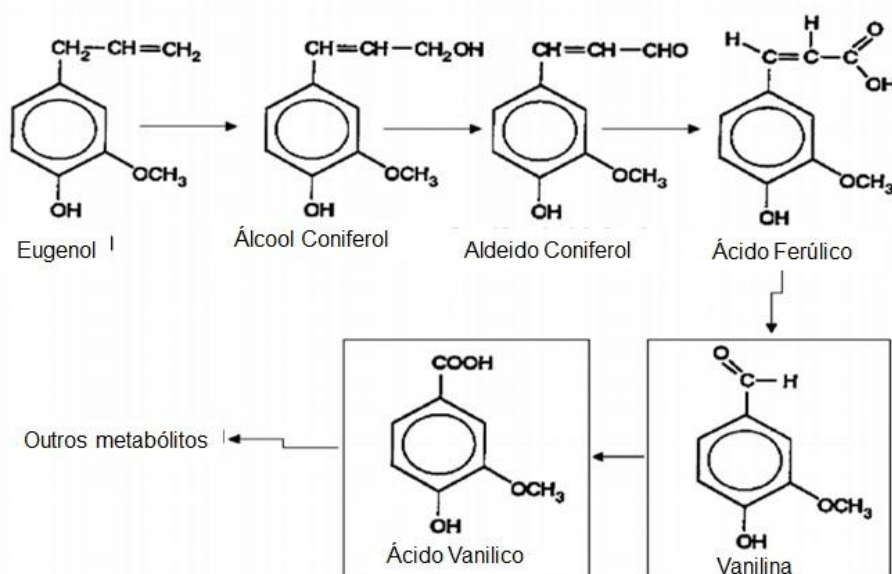


Figura 1.2 – Possível via de conversão de eugenol a vanilina proposta por Ashengroph *et al.* (2011) a partir de seus estudos com *Pseudomonas resinovorans* SPR1.

2 PRODUÇÃO DE VANILINA POR *Vanilla*

2.1 Considerações gerais

O gênero *Vanilla* é composto por aproximadamente 100 espécies e elas são originárias da América Central (México) e algumas espécies do Taiti. As principais espécies produtoras de vanilina são *V. planifolia*, *V. tahitensis*, *V. pompona* Arditti² e Porteres³ (1992 e 1954, citados por Schlüter *et al.* 2007). Esta orquídea é a única que tem interesse comercial sem o objetivo de ornamento (Pacheco e Damasio, 2010).

² ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. John Wiley and Sons, New York, 1992.

³ PORTERES, R. **Le gene *Vanilla* et ses espèces**: in G. Bouriquet, ed. *Le Vanillier et la Vanilla dans le monde*. Éditions Paul Lechevalier, p. 93-290, Paris, 1954.

Quando cultivada em regiões fora de sua área nativa necessita de polinização manual, o que torna seu cultivo muito dispendioso (Berger *et al.*, 2000).

Nas favas verdes de *Vanilla* a vanilina está presente apenas como forma conjugada de β -D-glicosídeos de vanilina ou glicovanilina, mais precisamente na placenta da fava (Odoux *et al.*, 2003). Estes β -D-glicosídeos não apresentam nenhuma característica aromática da vanilina, portanto há a necessidade do processo de cura para catalisar sua conversão (Walton *et al.*, 2003). No processo de cura as favas são desidratadas lentamente, sendo inicialmente imersas rapidamente em água aquecida à 70°C e em seguida são levadas para a secagem que pode ser feita em estufa (14 dias) ou ao sol (50 dias) e depois colocadas à sombra em tabuleiros (Filho *et al.*, 2014).

Os estudos para elucidar rotas metabólicas sugerem o ácido ferúlico como precursor nas vias bioquímicas de produção de vanilina em *Vanilla* (Figuras 1.1 e 1.3).

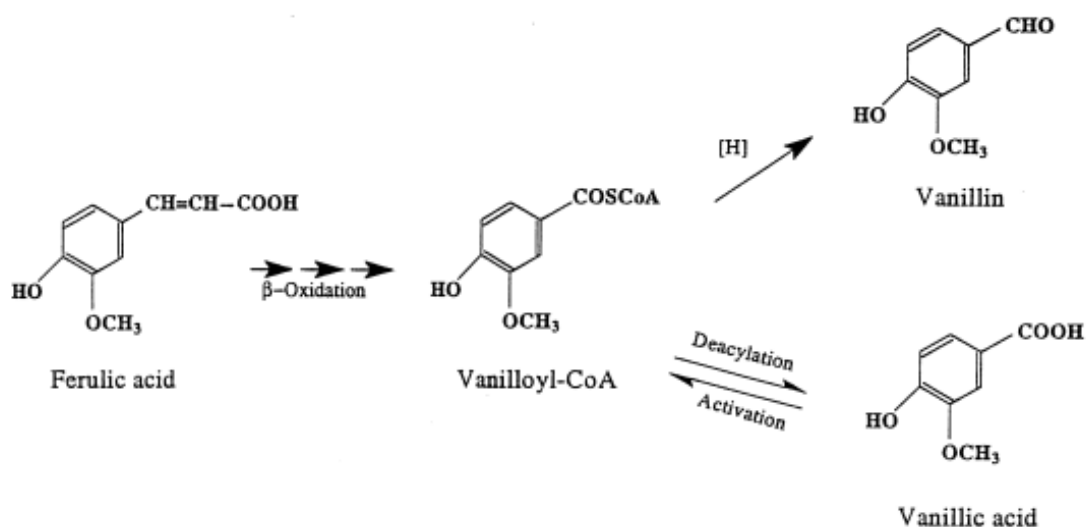


Figura 1.3 – Rota de formação de vanilina em *Vanilla* a partir de ácido ferúlico, adaptada por Walton *et al.* (2003) a partir da rota proposta por Zenk (1965).

Neste processo o ácido ferúlico é convertido em feruloil CoA e depois em vaniloil CoA até chegar a vanilina.

Outras plantas podem apresentar alguns compostos cujas características aromáticas podem ser semelhantes à vanilina. É o caso da *Dipteryx odorata* (Figura 1.4), uma planta originária do norte da América do Sul até a América Central, mais precisamente no Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guiana, Honduras, Jamaica, México, Panamá e Venezuela. No Brasil é comumente conhecida como Cumaru. Suas

sementes também chamadas de favas são utilizadas em alguns casos como aditivo nos alimentos em substituição à vanilina, por apresentar aroma com características semelhantes. Ela apresenta porte arbóreo e sua madeira tem cor amarelo-marrom ou vermelho-marrom com alta densidade e dureza, podendo ser aplicada na construção de pisos, pontes e decks de navios (Forest Legality Alliance, 2014).



Figura 1.4 – Árvore da espécie *Depterix odorata*, conhecida no Brasil por vários nomes comuns, incluindo Cumaru (Fonte <http://www.arboreo.net/2012/12/champagne-dipteryx-odorata.html>).

Sua classificação taxonômica é apresentada por Carvalho (2009) como:

Divisão: Angiospermae
Clado: Eurosídeas I
Ordem: Fabales (Cronquist classifica como Rosales)
Família: Fabaceae (Cronquist classifica como Leguminosae)
Subfamília: Faboideae (Papilionoideae)
Gênero: *Dipteryx*
Espécie: *Dipteryx odorata* (Aublet) Willd.

Segundo Carvalho (2009), das favas ou sementes do cumaru pode-se obter fortificante com propriedades anestésicas usado em problemas respiratórios e cardíacos e no combate a vermes, incluindo-se amebíase. Com a casca pode-se preparar um xarope usado no combate a tosses, gripes e problemas pulmonares.

O óleo da amêndoa pode ser usado diretamente em úlcera bucal, otite (dor de ouvido), em problemas no couro cabeludo e combate a vermes, incluindo-se amebíase.

As sementes dessa espécie são constituídas de 30 % a 40 % (peso seco) de um óleo amarelo-claro, perfumado que é a cumarina (anidrido cumarínico), que se oxida rapidamente em contato com o ar e é uma essência aromática usada como narcótico, estimulante e como fixador na indústria de perfumes.

2.1.1 Cultivo de células, tecidos e órgãos de *Vanilla*

O cultivo de células e tecidos de plantas é uma técnica considerada recente sendo os primeiros trabalhos nesta área do início do século XX. Esta técnica já conquistou uma posição de destaque nos estudos biotecnológicos, visto que é muito empregada em investigações e processos que envolvem tanto a fisiologia vegetal quanto a produção *in vitro* dos produtos do metabolismo secundário das plantas (Carvalho e Vidal, 2003). A produção de compostos gerados no metabolismo secundário das plantas tem grande interesse comercial devido à sua importância para o homem. Além disso, os sistemas de cultivo de tecido vegetal apresentam-se como uma boa ferramenta para modificações nas atividades biológicas das moléculas de interesse (Mulabagal & Tsay, 2004). Giri *et al.* (2001) em seu trabalho de revisão comentam a importância e os fatores que interferem nos processos de biotransformação usando cultivo celular, de tecido e órgãos de plantas, bem como apresentam diversas maneiras de aplicações desta técnica nos estudos de bioconversão.

Os compostos secundários nos vegetais são aqueles que não são produzidos de maneira uniforme em todo o corpo da planta. Dentre estas moléculas estão os compostos fenólicos dos quais faz parte a vanilina e estes compostos são normalmente usados na planta para processos reprodutivos e defesa contra microrganismos (Peres, 2004). No caso da vanilina sua função na planta é proporcionar a proteção das sementes e também um possível efeito na germinação das mesmas, visto que ela está concentrada na região de localização das sementes no interior da fava (Odoux *et al.*, 2003).

2.1.2 Processo produtivo

No intuito de entender as vias de produção de vanilina na planta *Vanilla*, bem como de estabelecer um processo que a partir do cultivo de células vegetais, muitos estudos têm proposto protocolos de cultivo vegetal e possíveis vias metabólicas com seus respectivos genes e enzimas envolvidos. Kalimuthu *et al.* (2006) propuseram um meio MS combinado com o regulador de crescimento 6-benzilamino purina (BAP) e água de coco como meio inicial para multiplicação de *Vanilla planifolia*. Já Njoroge *et al.* (2007) sugerem dois tipos de meio para cultivo de *Vanilla planifolia*, sendo um para iniciar o cultivo o BNRT (MS + 160 mg/L de sulfato de adenina, 40 mg/L de L-cisteína, 150 mg/L de ácido ascórbico, 150 mg/L de ácido cítrico) e outro para manutenção o BNMT (MS, 160 mg/L de sulfato de adenina, 40 mg/L L-cisteína, 150 mg/L ácido ascórbico, 150 mg/L de ácido cítrico, 10 mg/L de BAP). Outros protocolos têm sido apresentados para cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia*, sugerindo meio MS básico acrescido de 0,5 mg/L de cinetina e 20 g/L de sacarose para germinação de sementes. Para multiplicação e manutenção das plantas, foi proposto o MS contendo 1 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de ácido indolil butírico (IBA). Para produção de calos neste caso o melhor resultado foi obtido com o meio MS básico suplementado com 1 mg/L de 6-benzilamino purina BAP e 0,5 mg/L de ácido alfa naftalenoacético (ANA), sendo que os explantes devem ser mantidos no escuro por 2-5 dias para a indução da calogênese (Divakaran & Babu, 2009).

Janarthanam e Seshadri (2008) usaram explantes medindo 0,5 a 1,0 cm de comprimento para estabelecer cultura *in vitro* de *Vanilla planifolia* em meio MS basal acrescido de 8,88 μ M de BAP e 8,08 μ M de ANA. Depois de estabelecida a cultura, os autores testaram a produção de calos usando o ácido diclofenoxiacético (2,4-D) e ANA e concluíram que o 2,4-D foi mais eficiente na indução da calogênese quando associado ao BAP.

Abebe *et al.* (2009) estudaram as respostas de explantes nodais de *Vanilla planifolia* a diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg/L), ANA (0; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25 mg/L) e cinetina (0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L). Eles concluíram que não houve diferenças significativas entre a multiplicação de raízes quando usaram meio livre de reguladores e qualquer concentração de ANA, porém com relação à presença de BAP foi possível observar diferença significativa entre o meio sem reguladores e as combinações de BAP com ANA e com cinetina.

A produção de vanilina na planta *Vanilla* a partir de ácido ferúlico foi reforçada por Negishi *et al.* (2009) ao demonstrarem atividade de uma enzima chave para esta via no extrato de células livres de favas de *Vanilla planifolia*. Dignum *et al.* (2004) conseguiram identificar β -D-glicosídeos em fava verde de *Vanilla* e também conseguiram mostrar a atividade e especificidade da β -D-glicosidase para estes glicosídeos, reforçando o papel chave desta enzima na conversão destes glicosídeos em vanilina, sendo que Sommer *et al.* (1997) já haviam demonstrado a produção de glicosídeos de vanilina em cultura de células de *Vanilla planifolia*.

A produção de vanilina na planta de *Vanilla* pode não ser exclusivamente devido à atividade das enzimas vegetais. General *et al.* (2009) encontraram leveduras endofíticas na *Vanilla* e puderam constatar que algumas delas possuíam atividade da β -D-glicosidase, analisando a capacidade das cepas isoladas em biotransformar ácido ferúlico em ácido vanílico. Isto levou os autores a sugerirem uma possível contribuição destes microrganismos para a produção de vanilina no vegetal. Dentre as leveduras isoladas a linhagem *Bullera* MVY 22 foi a que apresentou maior atividade da enzima por ter apresentado alta taxa de conversão de ácido ferúlico.

3 PRODUÇÃO DE VANILINA POR VIA MICROBIANA

3.1 Cultivos

Os processos fermentativos podem ser divididos em fermentação submersa e fermentação em estado sólido e/ou semissólido. No caso fermentação em estado sólido e/ou semissólido há pouca presença de água, sendo que a umidade máxima não pode passar de 80%. Este processo apresenta como vantagens sobre a submersa principalmente a maior produtividade volumétrica, maior concentração relativa de produto e menor geração de resíduos. Desta forma este processo mostra-se muito promissor. (Serafini, Barros e Azevedo, 2002; Pandey, Soccol e Larroche, 2007).

Na fermentação submersa o meio de cultura, apresenta alto teor de água e os nutrientes encontram dissolvidos nesta água, sendo utilizado principalmente para leveduras, bactérias e algas. Por definição, fermentação submersa é aquela na qual o micro-organismo produtor se desenvolve no interior do meio de fermentação, geralmente agitado. No caso de fermentações aeróbias, deve haver um suprimento de oxigênio necessário à população em desenvolvimento, o qual é feito através de um compressor, por borbulhamento de ar. Nesse tipo de fermentação é possível um maior controle no processo de fatores como pH, temperatura, porcentagem de oxigênio dissolvido no meio, concentração do produto e substrato também é possível a recuperação de enzimas extracelulares, a determinação de biomassa e consequente cinética de crescimento é facilitada (Pereira, 2007; Fernandes, 2010 e Wanderley, Neves e Andrade, 2011).

No caso de a fermentação ser aeróbia, deve haver um suprimento de oxigênio necessário à população em desenvolvimento, através de um compressor, por borbulhamento de ar. Na fermentação submersa é possível um maior controle no processo de fatores como pH, temperatura, porcentagem de oxigênio dissolvido no meio, concentração do produto e substrato também é possível a recuperação de enzimas extracelulares, a determinação de biomassa e consequente cinética de crescimento é facilitada (Serafini, Barros e Azevedo, 2002; Pandey, Soccol e Larroche, 2007; Pereira, 2007; Fernandes, 2010 e Wanderley, Neves e Andrade, 2011).

3.2 Metabolismo microbiano

Dentre as diversas espécies de microrganismos estudadas na produção de vanilina está o *Bacillus subtilis* (Gurujeyalakshmi e Mahadevan, 1987). Neste estudo a cepa isolada de solo nativo de floresta com presença de madeira em decomposição foi cultivada em meio com lignina como fonte de carbono. Depois o microrganismo foi cultivado em meio contendo ácido ferúlico, vanilina, ácido vanílico e ácido protocatecúrico separadamente. As células crescidas neste meio foram transferidas para solução tampão e as atividades enzimáticas foram medidas. Os resultados levaram à conclusão de que o *B. subtilis* foi capaz de utilizar todos os compostos aromáticos como fonte de carbono e na degradação do ácido ferúlico apresentou

mecanismos de encurtamento da cadeia lateral, oxidação do aldeído aromático a ácido, desmetilação, hidroxilação e clivagem do anel aromático.

O isolamento de microrganismos do ambiente é uma boa estratégia para se obter linhagens capazes de produzir vanilina de maneira considerável. *Bacillus subtilis* foi isolada de solo de casa de vegetação em meio Luria-Bertani (LB) e depois testada para a bioconversão de isoeugenol em vanilina. A eficiência molar máxima alcançada foi de 14% o que foi considerada baixa pelos autores (Shimoni *et al.*, 2000).

Uma linhagem mutante HS8 produzida a partir da cepa de *B. subtilis* isolada de solo de jardim em meio LB teve sua capacidade de conversão de isoeugenol a vanilina estudada. Os pesquisadores suplementaram o meio de cultivo com 10 g/L de isoeugenol e 1,36 g/L de vanilina foi a concentração máxima encontrada após 96 horas de fermentação. Neste trabalho foi possível também propor uma provável via de biotransformação do isoeugenol a vanilina (Figura 1.5) (Zhang *et al.*, 2006).

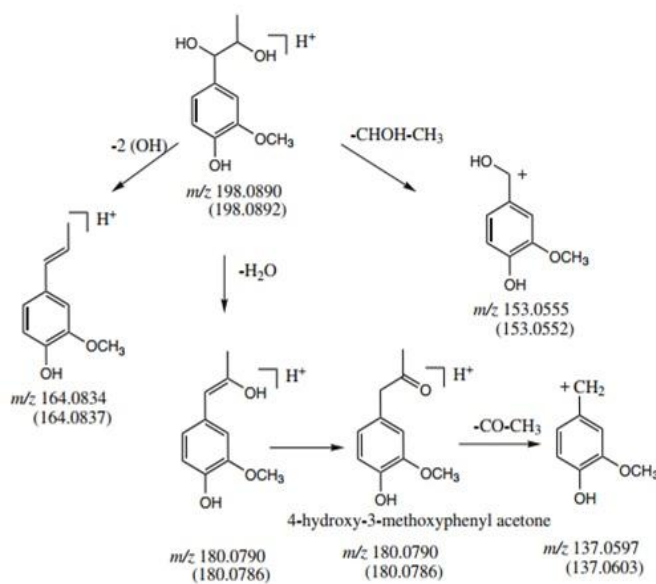


Figura 1.5 – Provável rota de formação de vanilina por *Bacillus subtilis* a partir de isoeugenol proposta por Zhang *et al.* (2006).

Para o gênero *Amycolatopsis* também foram feitas investigações sobre sua capacidade de produção de vanilina. Overhage *et al.* (2006) verificaram a utilização de eugenol como substrato para a produção de vanilina por uma linhagem

recombinante de *Amycolatopsis sp.* e puderam verificar apenas traços de vanilina no meio.

Outros gêneros ou espécies também têm sido estudados com o objetivo de desenvolver processos viáveis de produção de vanilina. Gioia *et al.* (2011) trabalharam com engenharia genética em *Pseudomonas fluorescens* BF13 para torná-la mais eficiente na conversão de ácido ferúlico em vanilina. Eles propuseram uma via de biotransformação (Figura 1.6) e obtiveram uma concentração máxima de vanilina de 3,46 mM com a adição de 5 mM de ácido ferúlico no meio de cultivo após 1,5 h do início da fermentação.

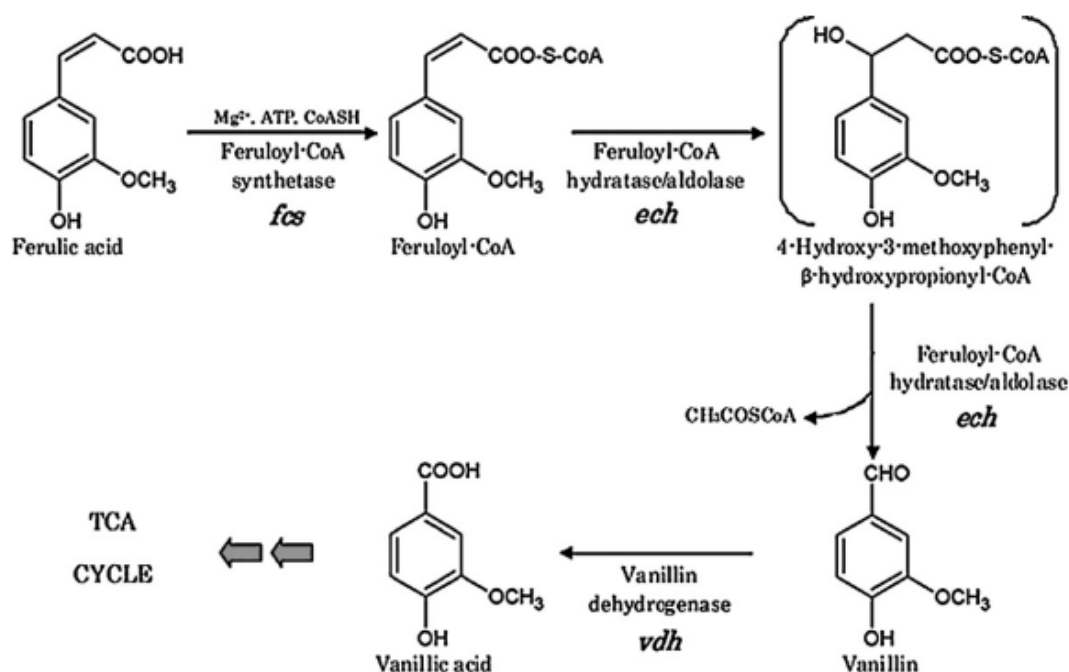


Figura 1.6 – Possível rota de formação de vanilina por *Pseudomonas fluorescens* a partir de ácido ferúlico proposta por Gioia *et al.* (2011).

Han *et al.* (2013) em seu trabalho de revisão apresentam algumas vias metabólicas bacterianas de biotransformação dos compostos fenilpropanóides em produtos naturalmente originais de plantas por células microbianas (Figuras 1.7 e 1.8). Os autores chamam a atenção para a importância do esclarecimento destas vias para o desenvolvimento de processos de produção biotecnológica de tais compostos, além da questão da toxicidade destas substâncias para os microrganismos e expressão eficiente dos genes da estabilidade fisiológica o que podem tornar difícil um processo viável de produção de tais compostos por via microbiana.

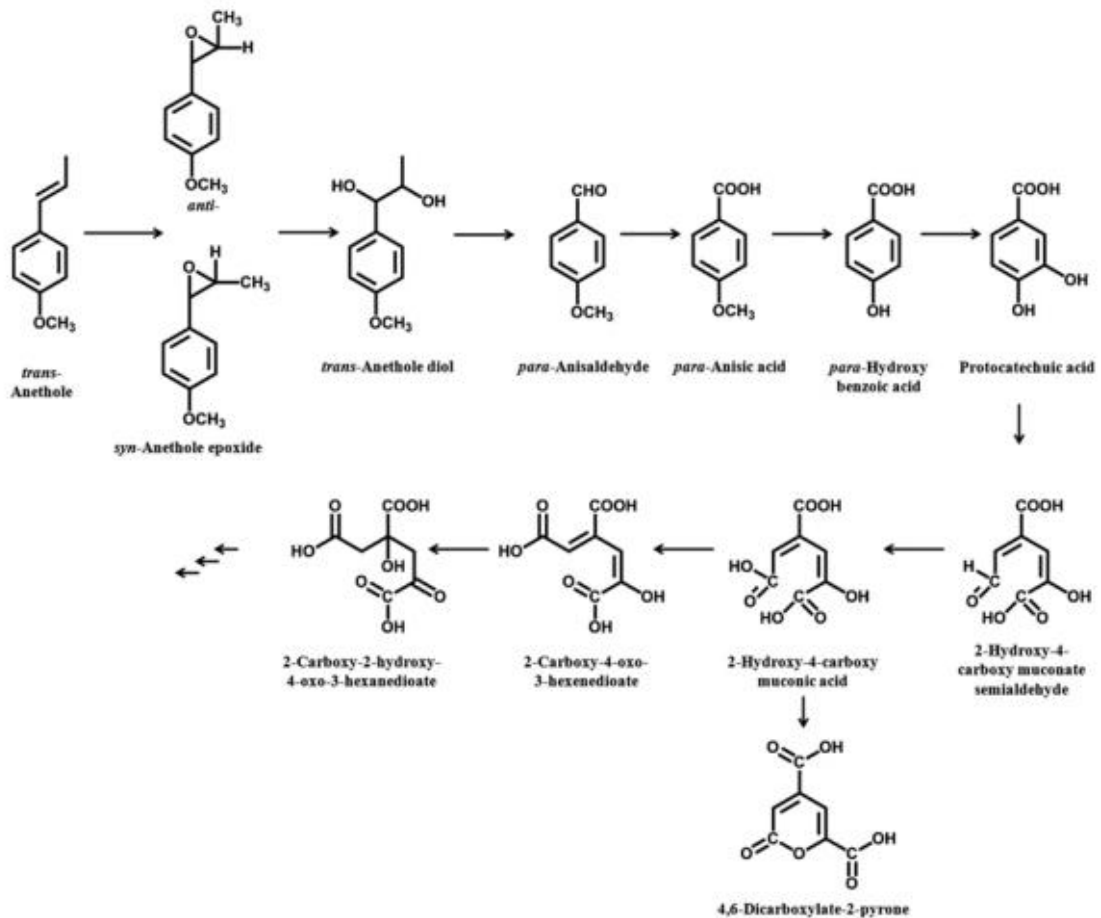


Figura 1.7 – Possível via de degradação de *trans-anethol* por *Pseudomonas putia* JYR-1 e *Arthrobacter* sp. TA13, proposta por (Shimoni *et al.*, 2002) adaptada de (Ryu *et al.* 2005).

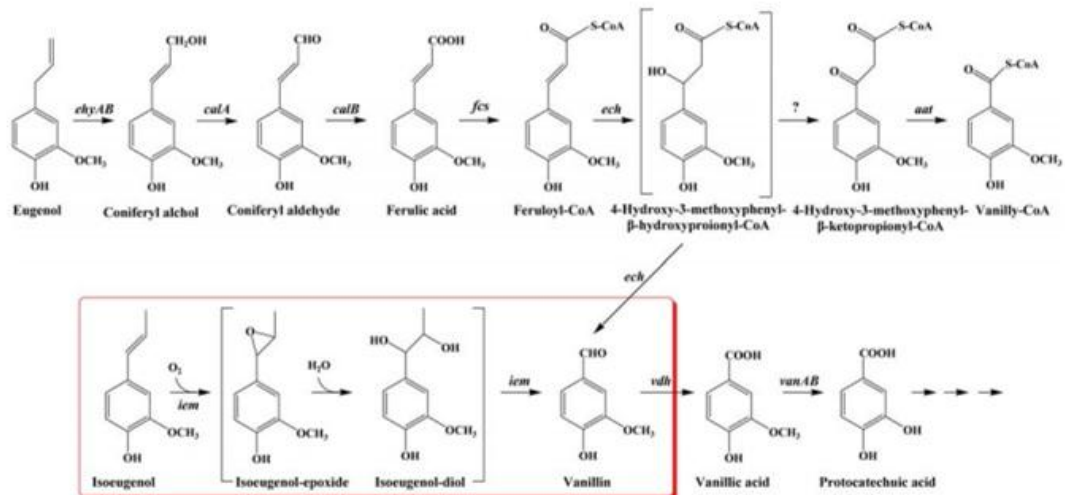


Figura 1.8 – Biotransformação de eugenol e isoeugenol por bactérias adaptadas de Ryu *et al.* (2010) por Han *et al.* (2013). As siglas ehyAB, calA, calB, fcs, ech, vdh, vdhAB, aat, e icm representam as enzimas eugenol hidroxilase, coniferil álcool desidrogenase, coniferil aldeído desidrogenase, feruloil-CoA-sintetase, enoil-CoA-hidratase/aldolase, vanilina desidrogenase, vanillato-O-dimetilase, β-cetotiolase, e isoeugenol monoxigenase, respectivamente.

3.3 Principais de microrganismos utilizados em processos biotecnológicos de produção de vanilina

3.3.1 *Bacillus subtilis*

Estes organismos não apresentam patogenicidade para os humanos, são bactérias gram-positivas e saprófitas que vivem tanto no solo quanto na água (Filho *et al.*, 2010). Quando em solo estas bactérias muitas vezes estão associadas ao sistema radicular das plantas e podem contribuir para o crescimento das mesmas (Stanley e Lazazzero, 2005).

Dentre as diversas aplicações do *B. subtilis* está a produção de enzimas como a fitase (Kerovuo *et al.*, 1998), estudos de genética molecular (Oh *et al.*, 2007), e produção de vanilina (Zhang *et al.*, 2006).

3.3.2 *Amycolatopsis orientalis*

O gênero *Amycolatopsis* foi proposto por (Majundar *et al.* 2006). Este gênero possui um grande interesse comercial por sua capacidade de produzir antibióticos, com exceção da *A. orientalis*. Contudo esta espécie possui uma interessante habilidade de degradação de compostos aromáticos como a linhagem DSM 43387 estudada por Grund *et al.* (1990).

Ayar-Kayali e Tarhan (2006) mostraram a produção de Vancomicina por *A. orientalis* em concentrações menores de glicose no meio. Outra importância dos microrganismos deste gênero é a habilidade de produzir enzimas envolvidas na conversão de ácido ferúlico à vanilina como as enzimas modificadas da cepa *Amycolatopsis* sp. HR167. Desta cepa foram retirados genes envolvidos no catabolismo do ácido ferúlico e depois inseridos em duas linhagens *Pseudomonas* sp. HR199 que não podiam metabolizar o ácido ferúlico. As duas linhagens mutantes produzidas foram então testadas e puderam a partir daí produzir a feruloil-CoA sintetase e a enoil-CoA hidratase/aldolase e utilizar o ácido ferúlico. Posteriormente as linhagens foram patenteadas. (Rabenhorst *et al.*, 2003).

3.4 Precursores mais utilizados nos processos de produção de vanilina por fermentação microbiana

O ácido ferúlico (ácido 4-Hidroxi-3-metoxicinamico) é naturalmente proveniente da parede celular de plantas onde se encontra amplamente distribuído em pequenas quantidades. Possui fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$. Este composto se apresenta como um pó amarelo pálido. É muito usado como antineoplásico, colerético, conservante alimentar, antioxidante, anti-inflamatório e potencializador de filtro solar. Sua massa molar é de 194,18 g/mol e é solúvel em água (Sarangi e Sahoo, 2010; Chemical book, 2014).

O eugenol (4-allyl-2-methosifenol) é um composto fenólico presente em alguns óleos essenciais, como no caso do cravo da Índia que é composto por 88% de eugenol, podendo se apresentar como um líquido incolor, amarelo pálido, claro ou de cor âmbar. Apresenta um odor de cravo e sabor picante. Ele pode ter diversas aplicações sendo utilizado como anestésicos para peixes, para minimizar o estresse do animal durante o manejo. Este composto também apresenta alguma atividade antiparasitária, sendo que na concentração de 100 µg/mL pode inibir em 17,34% e 40% o crescimento de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis* respectivamente (Inoue, et al. 2011; Devi et al. 2010 e Leite et al. 2013).

O eugenol é incompatível com oxidantes fortes incluindo o cloreto férrico e permanganato de potássio e também reage com bases fortes. O eugenol escurece e engrossa quando exposto ao ar e escurece com a idade podendo se decompor em exposição à luz. Ele não apresenta solubilidade em água e é um composto químico combustível com densidade de 1,0652 g/cm³ (20 °C), massa molar de 164,21 g/mol e fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$, com uso geral em perfumaria e processos de produção de vanilina (Chemical book, 2014).

O eugenol também apresenta comprovada atividade antimicrobiana para microrganismos como *Salmonella typhi*, podendo ser demonstrada pelo método de difusão em disco utilizando soluções de eugenol concentrações de 1% e 10% em discos de 6 mm ou preparando soluções de eugenol em diversas concentrações como 7,5 mM a 320 mM e depois as adicionando ao meio de cultura do microrganismos como *E. coli*. A interação de eugenol com outros antibióticos no controle do crescimento de *Escherichia coli* (NCIM 2931), *Enterobacter aerogenes* (NCIM 5139), *Proteus vulgaris* (NCIM 2813), *Salmonella typhimurium* (NCIM 2501), *Pseudomonas aeruginosa* (NCIM 5029) foi testada utilizando os antibióticos penicilina, oxacilina, eritromicina, polimixina B sulfato, tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina e rifampina.

Todos os compostos foram diluídos em solventes apropriados nas concentrações recomendadas e testados na presença de eugenol para cada microrganismo. Foi constatado que uma dose de eugenol 0,3g/kg massa corporal é necessária para o estabelecimento da sinergia do eugenol com os antibióticos (Devi *et al.*, 2010; Gill e Holey, 2005 e Hemaiswarya e Doble, 2009).

O isoeugenol (2-Metoxi-4-((E)-Propenil)-Fenol) tem formula molecular C₁₀H₁₂O₂ e massa molar 164,2 g/mol. Apresenta-se como um líquido viscoso amarelo-esverdeado com densidade de 1,082 g/mL at 25 °C estável e incompatível com agentes oxidantes fortes. Este composto ocorre em óleo de *Cananga odorata* (ylang-ylang) uma árvore muito comum na Polinésia e em outros óleos essenciais. O isoeugenol é ligeiramente solúvel em água e é um produto químico combustível (Manner e Elevitch, 2006; Chemical book, 2014).

Kaur e Sutana (2012) investigaram a eficácia do isoeugenol (4-propenil-2-methoxifenol) como coadjuvante no tratamento de artrite em ratos com artrite induzida. Eles administraram de 50 a 150 mg/kg isoeugenol /peso corporal nestes ratos para verificar a capacidade do isoeugenol como auxílio para o tratamento da artrite e concluíram que ele pode ser considerado um bom auxiliar.

3.5 Processos

Há algum tempo os pesquisadores estudam processos e microrganismos capazes de utilizar compostos fenólicos para produzir vanilina, dentre estas substâncias figuram com grande importância o ácido ferúlico, eugenol e o isoeugenol. Gurujeyalakshmi e Mahadevan (1987) estudaram a capacidade de *B. subtilis* de bioconverter ácido ferúlico em vanilina, Shimoni *et al.* (2000) investigaram a biotransformação de isoeugenol em vanilina também por *B. subtilis* B2, Zhang *et al.* (2006) conseguiram isolar uma linhagem de *B. subtilis* HS8 a qual utilizaram para converter isoeugenol em vanilina.

Muitas outras espécies de microrganismos também já foram utilizadas na tentativa de se alcançar uma produção de vanilina viável comercialmente. A metabolização de eugenol por *Rhodococcus sp.* I24 foi estudada e foi estabelecida uma via bioquímica sem β -oxidação do ácido ferúlico e depende da coenzima A

envolvendo as enzimas feruloil-CoA sintetase (Fcs), enoil-CoA hidratase/aldolase (Ech), e vanilin dehidrogenase (Vdh) (Plaggenborg *et al.*, 2006). Alguns destes microrganismos foram transformados geneticamente com a inserção de genes de outras espécies microbianas consideradas promissoras nos processos de produção biotecnológica de vanilina como no caso da *Escherichia coli* na qual foram colocados genes de *Amycolatopsis sp.* os quais codificam as enzimas feruloil-CoA sintetase e enoil-CoA hidratase/aldolase que participam na metabolização do ácido ferúlico (Yoon *et al.*, 2005).

Gasson *et al.* (1998) produziram mutantes de *P. fluorescens* linhagem AN103 e os utilizaram para identificar possíveis genes envolvidos na produção de enzimas que atuam no metabolismo de ácido ferúlico a vanilina e encontraram a enzima enoil-SCoA hidratase/liase como uma das responsáveis pela clivagem não oxidativa do feruloil-SCoA em vanilina.

O gênero *Amycolatopsis* é considerado um dos mais promissores para a produção de vanilina. Utilizando um biorreator de duas fases separadas sólida-liquida (TPPB) de 3 litros, Ma e Daugulis (2014) cultivaram a linhagem *Amycolatopsis sp.* ATCC 39116 e alcançaram uma produção de 19,5 g/L de vanilina a partir de 48 g/L de ácido ferúlico adicionado em alíquotas de 3 g/L ao longo da fermentação. Canterbury *et al.* (2011) patentearam um processo de extração e purificação de vanilina onde relatam a utilização de *Amycolatopsis sp.* IMI390106 na fermentação e produção de 10 g/L de vanilina.

4 ANÁLISES DA PRODUÇÃO DE VANILINA

As análises de compostos aromáticos produzidos a partir de processos biotecnológicos são, em sua grande maioria realizadas por técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Alguns trabalhos encontrados na literatura se propõem descrever metodologias de análise destes compostos como Anwar (1963) que descreve a cromatografia em papel para determinação de vanilina utilizando o reagente de Millon's modificado. Sinha *et al.* (2007) desenvolveram um método de RP-HPLC para análise da vanilina e outros compostos fenólicos presentes

em extratos de *Vanilla planifolia*. Goodner *et al.* (2000) fizeram a determinação da vanilina em suco de frutas utilizando as técnicas de GC-Olfatométrica e GC-MS/MS.

A presença de vanilina e metabólitos também é verificada utilizando cromatografia camada delgada (TLC), cromatografia em papel, cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), bem como espectrometria de massa (MS) sendo que as duas últimas podem ser ou não associadas à espectrometria de massa. Nestes casos as análises podem ser feitas com a combinação de duas destas técnicas como TLC e GC, GC e MS assim como podem ser utilizadas isoladamente como no caso da GC e da HPLC (Li *et al.*, 2008; Ashengroph, *et al.*, 2011; Shimoni *et al.*, 2000; Overhage *et al.*, 2006).

REFERÊNCIAS

ABEBE, Z.; MENGESHA, A.; TERESSA, A.; TEFERA, W. Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8, p. 6817-6821, 2009.

ANWAR, M. H. Paper chromatography of monohydrosyphenols in vanilla extract. **Analytical Chemistry**, vol. 35, N° 12, 1963.

ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHONI, H.; MOMENBEIK, F. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potencial of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. **New Biotechnology**. Vol. 28, n° 6, 2011.

AYAR-KAYALI, H.; TARBAN, L. Vancomycin antibiotic production and TCA-glyoxalate pathways depending on the glucose concentration in *Amycolatopsis orientalis*. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 38, p. 727-734, 2006.

BAIN & COMPANY; GAS ENERGY. Potencial de diversificação da indústria química brasileira. **Relatório 4 – Aromas**, sabores e fragrâncias. Rio de Janeiro, 2014.

BERGER, R. G. Aroma Biotechnology. **Springer**. Berlin, Heidelberg, New York, 2000.

CANTERBURY, S. H.; DARTFORD, S. M.; SURREY, T. W.; SURREY, K. R.; KENT, C. H. Preparation of vanillin transformation media by extraction by means supercritical fluids or gases. **United States Patent**, Patent n° US 7,981,646 B2. Jul. 19, 2011.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Noções de cultivo de tecidos vegetais. Embrapa algodão, **documentos 116**, 39 p., Campina Grande, 2003.

CARVALHO, P. E. R. Cumaru-ferro *Dipteryx odorata*. Embrapa Florestas, **Comunicado Técnico 225**, 8 p., Colombo, 2009.

CHEMICAL BOOK. Disponível em:

http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7208326_EN.htm. Acesso em: 24 out. 2014.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Production of vanillin: A biotechnological opportunity. São Paulo, **Química Nova**, vol. 28, N° 4, 2005.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol 130, p.107–115, 2010.

DIGNUM, M. J. W.; HEIJDEN, R.; KERLER, J.; WINKEL, C.; VERPOORTE, R. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and Kinetics of Vanilla β -Glucosidase. **Food Chemistry**. Vol. 85, p. 199-205, 2004.

DIVAKARAN, M.; BABU, N. Micropropagation and in *in vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **Methods in molecular biology protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants**, vol. 547, 2009.

FERNANDES, M. L. M. Produção de Lípases por Fermentação no estado sólido e sua utilização em Biocatálise. **Universidade Federal do Paraná** (2007) Disponível em:
<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/10745/1/maria%20luiza.PDF>>
Acessado em: 07 jun. 2010.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M. E PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, V. 4, nº 2, p. 12, 2010.

FILHO, G. A. F.; LEITE, J. B. V.; RAMOS, J. V. **Baunilha**. Disponível em:
<http://www.ceplac.gov.br/radar/baunilha.htm>. Acesso em: 16/09/2014.

FOREST LEGALITY ALLIANCE. *Dipteryx odorata*. Disponível em:
<http://risk.forestlegality.org/species/dipteryx-odorata>. Acesso em: 29/07/2014.

FUNK, C.; BRODELIUS, P. E. Phenylpropanoid metabolismo in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. **Plant Physiology**. Vol. 99, p. 256-262, 1992.

GASSON, M. J.; KITAMURA, Y.; MCLAUCHLAN, W. R.; NARBAD, A.; PARR, A. J.; PARSON, E. L. H.; PAYNE, J.; RHODES, M. J. C.; WLATON, N. J. Metabolismo of ferulic acid to vanillin. **Journal of Biological Chemistry**. Vol. 273, nº 7, p. 4163-4170, 1998.

GENERAL, T.; MAMATHA, V.; DIVYA, V.; APPAICH, K. A. A.; Diversity of yeast with β -Glycosidase activity in vanilla (*Vanilla planifolia*) plant. **Current Science**. Vol. 96, n° 11, p. 1501-1505, 2009.

GIOIA, D. D.; LUZIATELLI, F.; NEGRONI, A.; FICCA, A. G.; FAVA, F.; RUZZI, M. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. **Journal of Biotechnology**, vol. 156, p. 309-316, 2011.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**. Vol 108, p.1 – 9, 2006.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L. Biotransformations using plant cell, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology advances**. Vol. 19, p. 175-199, 2001.

GOODNER, K. L.; JELLA, P.†; ROUSEFF, R. L. Determination of vanillin in orange, grapefruit, tangerine, lemon and lime juices using GC-Olfactometry and GC-MS/MS. **Journal of Agricultural Food Chemical**, vol. 48, p. 2882-2886, 2000.

GRUND, E.; KNORR, C.; EICHENLAUB, R. Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. **Appl Environ Microbiol**. Vol. 56, p. 1459–1464, 1990.

GURUJEYALAKSHMI, G.; MAHADEVAN, A. Dissmilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*. **Current microbiology**. Vol. 16, p. 69-73, 1987.

HAN, D.; RYU, JI-Y.; LEE, H.; HUR, HOR-G. Bacterial Biotransformation of Phenylpropanoid Compounds for Producing Flavor and Fragrance Compounds. **J. Korean Soc Appl Biol Chem**. Vol. 56, p. 125-133, 2013.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**. Vol 16, p. 997–1005, 2009.

INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L.; RIBEIRO, P. T.; SILVA, A. M. D.; FFONSO, E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**. vol. 41, n° 2, p. 327 – 332, 2011.

JANARTHANAM, B.; SESHADRI, S. Planted regeneration leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In vitro*. **Cell Development Biology-Plant**. Vol. 44, p. 84-89, 2008.

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; MURUGALATHA, N. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – a tropical orchid. **Current Science**, vol. 91, n° 10, 2006.

KAUR, G.; SULTANA, S. Evaluation of antiarthritic activity of isoeugenol in adjuvant induced arthritis in murine model. **Food and Chemical Toxicology**. Vol 50, p. 2689–2695, 2012.

KEROVUO, J.; LAURAEUS, M. NURMINEN, P.; KALKKINEN, N.; APAJALAHTI, J.; Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel

phytase form *Bacillus subtilis*. **Applied Environmental Microbiology**. Vol. 64, nº6, 2079 p., 1998.

LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ALBUQUERQUE R. S.; BRITO, D. I. V.; LAVOR, A. K. L. S.; ALENCAR, L. B. B.; FERREIRA, S. R. T.; FERREIRA, J. V. A.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. Vol.18, nº 4, p. 522- 528, 2013.

LI, X.; YANG, J.; LI, X.; GU, W.; HUANG, J.; ZHANG, K.-Q. The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter* sp Px6-4 isolated from *Vanilla* root. **Process Biochemistry**. Vol. 43, p. 1132-1137, 2008.

MA, Xiao-kui; DAUGULIS, A. J. Transformation of Ferulic Acid to Vanillin Using a Fed-Batch Solid–Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor. **Biotechnol. Prog.** Vol. 30, nº 1, 2014.

MAJUNDAR, S.; PRABHGARAN, S. R.; SHIVAJI, S.; LAL, R. Reclassification of *Amycolatopsis orientalis* DSM 43387 as *amycolatopsis benoztilytica* sp. **Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Vol. 56, p. 199-204, 2006.

MANNER, H. I.; Elevitch, C. R. *Cananga odorata* (ylang-ylang). Species profile for pacific island. **Agroforestry**. Vol. 2, 2006.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PASTORE, G. M.; SOCCOL, C. R. Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. **Food Technol. Biotechnol.** Vol. 44, nº 1, p. 47– 51, 2006.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; RENATO, C. R.; FREITAS, J. S.; CHRISTENC, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. Vol. 6, p. 33 – 39, 2000.

MULABAGAL, V.; TSAY, H-S. Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. **International journal of applied Science and engineering**. Vol. 2, nº 1, p. 29-48, 2004.

MOREIRA, L. C. B.; VIEIRA, B. S.; JÚNIOR, C. V. M.; LOPES, E. A.; CANEDO, E. J. Ação nematicida do eugenol em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, vol. 43, nº 3, p. 286-291, 2013.

NEGISHI, O.; SUGIURA, K.; NEGISHI, Y. Biosynthesis of vanillin via ferulic acid in *Vanilla planifolia*. **Journal of agricultural and Food Chemistry**. Vol. 57, p. 9956-9961, 20019.

NJOROGE, A. M.; GITONGA, L.; MUTUMA, E.; MIMANO, L.; MACHARID, C.; WASILWA, L.; NULI, S.; KIURU, P. MUNGAI, A. **Propagation of high quality**

planting materials of vanilla (*Vanilla planifolia*) through tissue culture. National agricultural research laboratories, 2007.

ODOUX, E.; ESCOUTE, J.; VERDEIL, J.-L.; BRILLOUET, J.-M. Localiztion of β -Glucosidase acitivity and glucovanillin in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). **Annals of Botany**. Vol. 92, p. 437-444, 2003.

OH, Y.-K.; PALSSON, B. O.; PARK, S. M.; SHILLING, C. H.; NAHADEVAN, R. Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 282, n° 39, p. 28791-28799, 2007.

OVERHAGE, J.; STEMBUCHEL, A.; PRIEFERT, H. Harnessing eugenol as a substrate for production of aromatic compounds with recombinant strains of *Amycolatopsis* sp. HR167. **Journal of Biotechnology**, Vol. 125, p. 369-376, 2006.

PACHECO, S. M.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, propriedades e produção. **Química Nova**, vol. 32, N° 4, 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation. **Asiatech Publishers**, Inc. New Delhi, 517 p., 2007.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2004.

PEREIRA, C. D. A. Produção de Metabólitos Voláteis Frutais por *Kluyveromyces marxianus* em Fermentação Submersa em meio à base de melaço de Soja. **Universidade Federal do Paraná** (2007). Disponível em: <http://www.ppgbiotec.ufpr.br/gerenciador/Public/Upload/20090413151041_Camila%20Dall%20Agnol%20Pereira%202007.pdf>. Acesso em: 02 de jun. 2010.

PLAGGENBORG, R.; OVERHAGE, J.; LOOS, A.; ARCHER, J. A. C.; LESSARD, P.; SIMSKEY, A. J.; STEINBÜCHEL, A.; PRIEFET, H. Potencial *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from acid ferulic and eugenol. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**. Vol. 72, p. 745-755, 2006.

PODSTOLSKI, A.; HAVKIN-FRENKEL, D.; MALINOWSKI, J.; BLOUNT, J. W.; KOURTEVA, G.; DIXON, R. A. Unusual 4-hydroxibenzaldehyde synthase activity form tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. **Phytochemistry**. Vol. 61, p. 611-620, 2002.

RABENHORST, J.; STEINBUCHEL, A.; PRIEFERT, H.; ACHTERHOLT, S. Enzyme and genes used for producing vanilin. **United States Patent Application Publication**. Pub. n° US 2003/00921143 A1, May 15, 2003.

SANTOS, R. Os aromas. **Food Ingredientes Brasil**, n.8, 2009.

SARANGI, P. K.; SAHOO, H. P. Enhancing the rate of ferulic acid bioconversion utilizing glucose as carbon source. **Journal of American Science**. Vol 6, n°5, 2010.

SCHLÜTER, P. M.; ARENAS, M. A. S.; HARRIS, S. A. Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). **Economic Botany**. Vol. 61, n°4, p. 328-336, 2007.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. **EDUCS**. Caxias do Sul, 433 p., 2002.

SHIMONI, E.; RAVID, U.; SHOLAM, Y. Isolation of a *Bacillus* sp capable of trnsforming isoeugenol to vanillin. **Journal of Biotechnology**. Vol 78, p. 1-9, 2000.

SINHA, A. K.; VERMA, S. C.; SHARMA, U. K. Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. **Journal of Separation Science**, vol. 30, p. 15-20, 2007.

STANLEY, N. R.; LAZAZZERO, B. A. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. **Molecular Biology**. Vol. 57, nº4, p. 1143-1158, 2005.

WALTON, N.; MAUER, M. J.; NARBAD, A. Molecules of interest vanillin. **Phytochemistry**, vol. 63, p. 505-515, 2003.

YOON, S.-H.; LI, C.; KIN, J.-E.; LEE, S.-H.; YOON, J.-Y.; CHOI, M.-S.; SEO, , W.-T.; YANG, J.-K.; KIN, J.-Y.; KIN, S.-W. Production of vanillin by metabolical engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**. Vol. 27, p. 1829-1832, 2005.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Citino**. Vol. 1, nº. 1, 2011.

ZHANG, Y.; XU, P.; HAN, S.; YAN, H.; MA, C. Metabolismo f isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. **Applied Microbiol Biotechnology**. Vol. 73, p. 771-779, 2006.

CAPÍTULO 2

CULTIVO DE TECIDO E CÉLULAS DE *Vanilla planifolia*

1 INTRODUÇÃO

A cultura *in vitro* de vegetais é feita através do cultivo de células, tecidos e órgãos de plantas em condições físicas e químicas definidas e em total assepsia. Esta técnica constitui uma importante ferramenta tanto para estudos básicos como para os aplicados, como transformação genética e produção de metabólitos secundários (Neto e Andrade 2009).

Neto e Andrade (2009) também distinguem esta técnica em duas partes, uma organizada onde se tem o estabelecimento da cultura através do cultivo de meristema e embriões, por exemplo, e outra, não organizada que pode ser exemplificada pela produção de calos os quais são uma massa celular desordenada. Os autores elencam dentre as aplicações da cultura de tecido vegetal a obtenção de compostos biotecnológicos e afirmam que para se ter sucesso neste campo há a necessidade de produção de células vegetais em larga escala.

Segundo Hrazdina (2006) os primeiros experimentos com cultura de tecido datam de 110 anos atrás e até hoje a cultura de células vegetais, em particular, mostra-se promissora para a produção em larga escala de valiosos produtos originários de plantas. Contudo, o uso comercial desta técnica não é muito comum devido a fatores como dificuldade no desenvolvimento de métodos de cultivo, na reprodutibilidade das técnicas e no alcance de concentrações consideráveis de produtos em um determinado período de tempo (Giri *et al.* 2001). Para Hrazdina (2006) os principais fatores que impedem um maior emprego desta técnica na produção industrial de compostos aromáticos são o custo consideravelmente alto e as complicadas questões fisiológicas das plantas. Este autor conclui que os avanços nos estudos da genômica, proteômica e metabolômica podem melhorar as habilidades em manipular estes sistemas de produção.

Várias metodologias de cultivo de células *V. planifolia* são conhecidas e foram desenvolvidas a fim de entender as vias de produção de vanilina nesta planta (Gantait *et al.*, 2011), ou para estudos da atividade de enzimas envolvidas na produção da vanilina (Podstolski *et al.* 2002), ou ainda, propondo novas metodologias de regeneração e multiplicação de *V. planifolia* (Kalimuthu, Senthilkumar e Murugalatha, 2006; Neelannavar, 2006; Njoroge *et al.* 2007).

Divakaran e Babu, (2009) estabeleceram protocolos para a germinação, manutenção, calogênese e produção de sementes sintéticas de *Vanilla planifolia*, *V. andamanica*, *V. tahitensis*, *V. aphylla*, e *V. pilífera* utilizando meio MS com 1 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg/L de ácido 3-Indolbutírico (AIB) e conseguiram uma taxa de multiplicação para cada explante de 1:12. Os autores também definiram como melhor condição para produção de calos o meio MS acrescido de 1 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de ácido naftaleno acético (ANA) e concluíram que quando o meio MS contendo 30 g/L de sacarose é usado para experimentos cultivo *in vitro*, as culturas crescem rapidamente em vasos e dentro de 180 dias estão cheias de brotos o que pode levar as plantas a secarem muito rapidamente. Para prevenir esta situação deve-se modificar o meio de cultura, reduzindo a concentração de sacarose para 10-15 g/L, meio meia força, ou seja contendo metade da concentração normal das soluções e adicionar de 10-15 mg/L de manitol. Esta mudança resultaria em redução na taxa de crescimento de ramos de 2-3 cm em 360 dias e a uma maior taxa de sobrevivência, pelo menos, 80%.

Mulabagal e Tsay (2004) também apresentam o cultivo de tecido e células vegetais como uma boa alternativa para a produção de compostos medicinais, fragrâncias, corantes e aromáticos, que não podem ser produzidos por via microbiana.

Para se conduzir um cultivo de tecido *in vitro* são necessários estabelecer as condições ambientais e a composição do meio de cultura de acordo com as exigências de cada espécie ou variedade de planta. Dentre os componentes do meio estão os reguladores de crescimento, divididos em três grupos principais as Auxinas, Citocininas e Giberelinas. As auxinas são utilizadas para induzir desenvolvimento de nós, formação de calos e desenvolvimento de raízes, sendo que os mais utilizados no cultivo vegetal são ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As Citocininas atuam na divisão celular e os principais são kinetina (KIN), zeatina, 6-benzilaminopurina

(BAP ou BA), 6-(g-g-dimetilalimino) purina (2iP). Por fim as Giberelinas que estimulam o desenvolvimento de nós e crescimento de meristemas ou gemas e inibem a formação de raízes e brotos, o principal é o ácido giberélico (GA3) (Carvalho e Vidal, 2003).

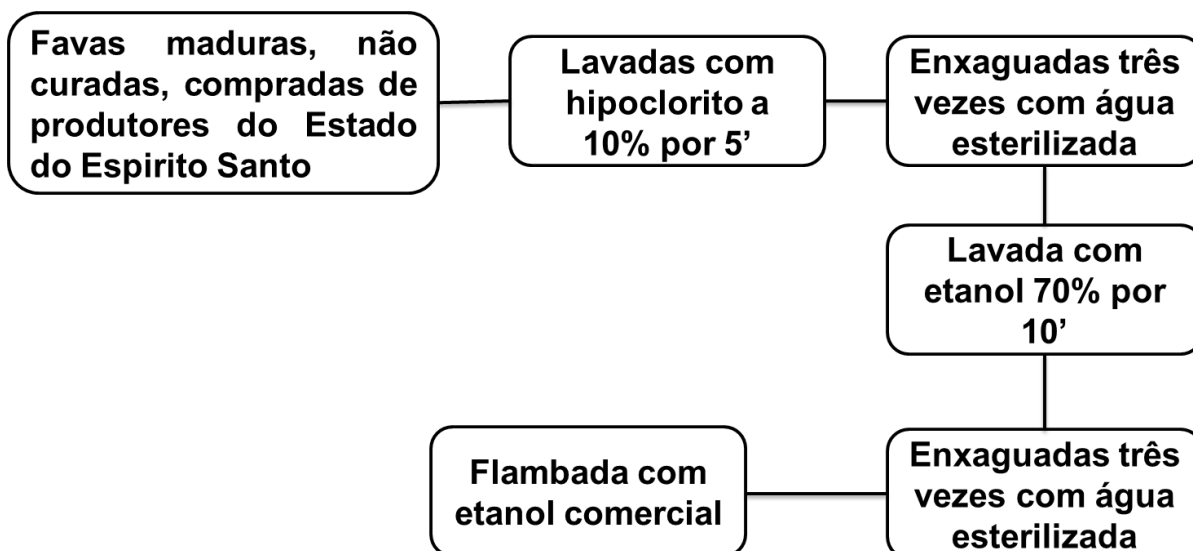
O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma cultura *in vitro* de *Vanilla planifolia* com desenvolvimento de calos, para estudo da capacidade da produção de vanilina a partir de células em suspensão em co-cultivo com microrganismos na presença do precursor ácido ferúlico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DE TECIDO VEGETAL

O cultivo de tecido vegetal foi estabelecido a partir de favas maduras de *Vanilla planifolia* (Jacks. ex Andrews) que não haviam passado pelo processo de cura. As favas foram adquiridas de produtores rurais do Espírito Santo.

Para a germinação assimbiótica das sementes de *V. planifolia*, as favas foram submetidas a um processo de desinfecção, onde foram lavadas com hipoclorito comercial a 10% durante 5 minutos e enxaguadas com água destilada estéril por três vezes. Após este processo, o material foi lavado em álcool etílico a 70% por 10 minutos e enxaguado novamente três vezes em água destilada esterilizada, e então com a utilização de etanol comercial e uma lamparina procedeu-se a flambagem da parte externa da fava conforme Fluxograma 1 (adaptado de Neelannavar, 2006; Tsuru *et al.*, 2000; Andrade, 2002; Divakaran & Babu, 2009).



Fluxograma 1 – Ilustração do procedimento realizado para desinfecção das favas para retirada das sementes de *Vanilla planifolia* afim de implantar a cultura da planta.

Depois das etapas de desinfecção, as vagens foram abertas com um bisturi esterilizado e as sementes foram transferidas para um recipiente com água destilada estéril contendo 30 µL de Tween 80. Uma alíquota de 1 mL desta suspensão de sementes foi transferida para frascos com 20 mL de meio de cultivo estéril.

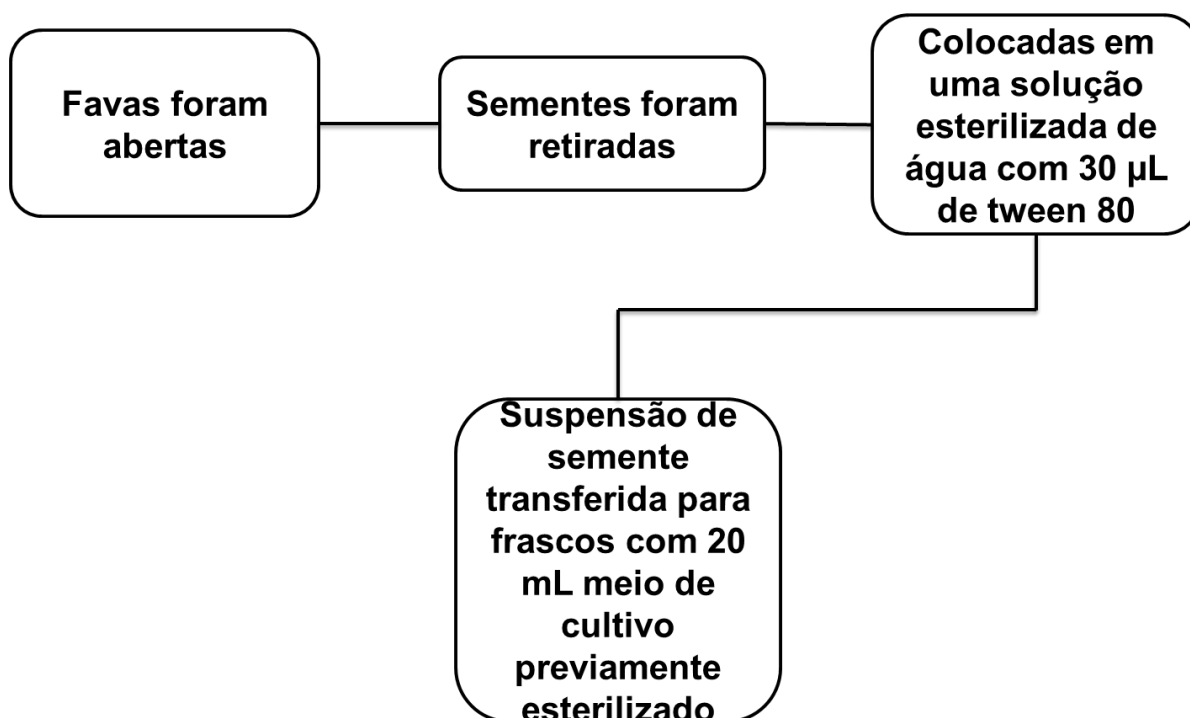
O meio de cultivo utilizado para a germinação das sementes foi o meio básico Murashige & Skoog, 1962 (MS), cuja composição está apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição original do meio MS.

SOLUÇÃO ESTOQUE	SAIS	CONC. FINAL (MG/L)	QUANTIDADE P/ 1000 ML (G)	VOL. P/ 1000 ML DE MEIO
A	NH ₄ NO ₃	1650	82,5	20
B	KNO ₃	1900	95	20
C	H ₃ BO ₃	6,2	1,24	5
	KH ₂ PO ₄	170	34	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,05	
	KI	0,83	0,166	
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025	0,005	
D	CaCl ₂ OU	332	66,44	5
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	88	5
E	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	74	5

	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	4,46	
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,005	
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6	1,72	
F	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8	5,56	5
	NA ₂ . EDTA	37,3	7,46	
ÁC. NICOTINICO		0,5	0,05	10
MIO-INOSITOL		100	0,01	10
TIAMINA		0,1	0,01	10
PIRIDOXINA HCl		0,5	0,05	10
GLICINA		2	0,20	10

O meio básico foi acrescido de 0,5 mg/L de cinetina, 20 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar (Divakaran e Babu, 2009).



Fluxograma 2 – Ilustração do procedimento realizado para preparo da suspensão de sementes de *Vanilla planifolia* para inocular em meio de cultivo.

Após a formulação, o meio foi acondicionado em frasco de boca larga e autoclavado por 15 min a 121 °C e depois, antes do meio esfriar, os frascos foram vedados com filme PVC para evitar a contaminação (Figura 2.1).

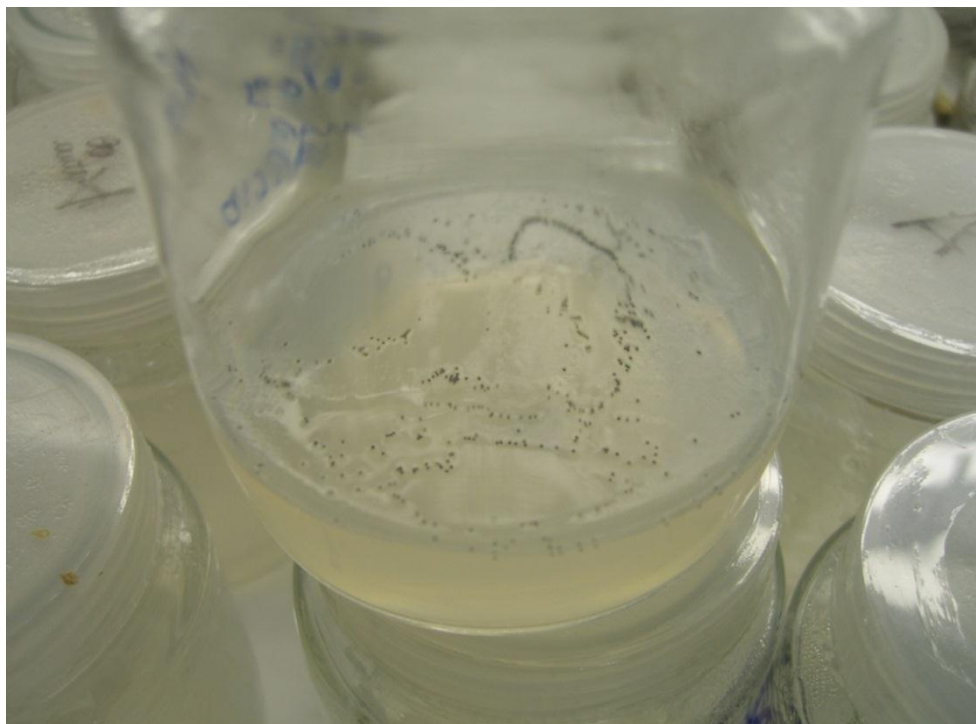


Figura 2.1 – Frascos com meios de cultura para germinação de *Vanilla planifolia*. os pontos pretos aparentes na foto são as sementes da orquídea.

Os frascos com meio e as sementes inoculadas, foram mantidos em uma sala de vegetação com luminosidade e temperatura controladas. A temperatura foi de 26 °C e o fotoperíodo foi de 16 horas com irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As plantas que germinaram foram utilizadas para a propagação nos estudos posteriores em meio MS com 1 mg/L BAP e 0,5 mg/L de AIB (Divakaran e Babu, 2009). A partir daí iniciaram-se os testes para estabelecer protocolos adequados para a propagação, calogênese e cultivo de células vegetais. Os meios testados foram o MS básico e o MS com variações nas concentrações de dois reguladores de crescimento, BAP e ANA (0,5 mg/L a 1,25 mg/L).

2.2 PRODUÇÃO DE CALOS

Os testes para formação de calos vegetais foram feitos utilizando explantes de plantas germinadas, transferindo-se assepticamente segmentos de caules de brotos, raízes ou protocórmios para o meio de indução de calos conforme descrito a seguir. Inicialmente as culturas foram mantidas no escuro para indução de calos por 5 dias. Os resultados foram colhidos em 6 semanas por causa da validade do meio de cultivo e parte do material foi utilizado para regeneração de novas plantas.

Em uma primeira sequência de experimentos, foram realizados ensaios utilizando meio MS suplementado com combinações de BAP (0,5 mg/L - 1,5 mg/L) e ANA (0,5 mg/L - 1,5 mg/L), variando de 0,25 em 0,25 mg/L. As concentrações iniciais de BAP e ANA foram determinadas a partir das concentrações propostas por Divakaran e Babu (2009). Na segunda sequência de experimentos foram realizados ensaios com meio MS variando as concentrações de ANA e TDZ (tidiazuron) a partir das concentrações propostas por Divakaran e Babu (2009) conforme Tabela 2.3.

Tabela – 2.3 Combinações dos reguladores de crescimento ANA e TDZ adicionados no meio MS nos ensaios de indução de calos de *V. planifolia*.

Concentração de ANA (µL/L)	Concentração de TDZ (µL/L)
75 a 125	32,75
	45
	56,25

As plantas remanescentes foram aclimatizadas inicialmente na sala de vegetação em meio líquido não estéril o qual foi gradativamente substituído por água. Após uma semana as plantas foram levadas para fora da casa de vegetação e expostas às condições ambientais, porém ainda em água onde permaneceram por mais 15 dias antes de serem colocadas no substrato definitivo conforme adaptação de Silva *et al.* (2011).

3 RESULTADOS

3.1 CULTIVO DE TECIDO VEGETAL

As sementes de *Vanilla planifolia* levaram 12 meses para germinar a partir da data de inoculação até a germinação da primeira semente. As plantas que se desenvolveram foram utilizadas para a etapa de micro propagação vegetativa e, conseqüentemente, para cultivo *in vitro* da orquídea, seguindo o protocolo proposto

por Divakaran e Babu (2009). A cultura pode ser mantida em meio livre de hormônios (Figura 2.2) durante aproximadamente 20 semanas até a aclimatização e a transferência das plantas para vasos com substrato (Figura 2.3) apropriado às quais apresentaram um percentual de sobrevivência de 60%. O fato de a cultura ter sido mantida em meio livre de reguladores de crescimento está de acordo com Abebe *et al.* (2009) que não encontrou diferença significativa no cultivo de *Vanilla* em meio com e sem reguladores de crescimento. Outros protocolos para o cultivo desta espécie têm sido relatados. Kalimuthu, Senthilkumar e Murugalatha (2006) testaram diferentes concentrações de BAP e água de coco como reguladores de crescimento no cultivo e manutenção da cultura de *Vanilla* em meio MS. Os autores puderam demonstrar que várias combinações foram eficientes para início e manutenção da cultura, mas a adição de 1 mg de BAP foi a melhor. O mesmo foi encontrado por Neelannavar 2006. Assim, nossos resultados confirmam o que é apresentado na literatura mesmo considerando outros tipos de reguladores de crescimento.



Figura 2.2 – Planta de *Vanilla* crescendo em meio MS em sala de vegetação.



Figura 2.3 – Planta de Vanilla crescendo em vaso com substrato apropriado, após processo de aclimação.

3.2 PRODUÇÃO DE CALOS

Na produção de calos da orquídea nos primeiros experimentos houve formação de calos (Tabela 2.4) mas não os friáveis como era esperado.

TABELA 2.4 – Resultados da experiência de indução de calos utilizando diferentes combinações de BAP e ANA. Os sinais (-) representam não formação de calos e os (+) indicam que houve formação de calos.

Concentração de BAP (mg/L)	Concentração de ANA (mg/L)	Resultados
0,5	0,5	-
	0,75	+
	1,0	-
	1,25	+
	1,5	-
0,75	0,5	+
	0,75	+
	1,0	-
	1,25	+

	1,5	-
1,0	0,5	-
	0,75	-
	1,0	-
	1,25	-
	1,5	-
1,25	0,5	-
	0,75	+
	1,0	-
	1,25	-
	1,5	+
1,5	0,5	-
	0,75	+
	1,0	-
	1,25	-
	1,5	-

A partir dos resultados observados pode-se afirmar que alguns tratamentos foram positivos para a calogênese da planta estudada, contudo não foram produzidos calos viáveis, ou seja calos friáveis com pouca aderência celular. Considerou-se que calos friáveis eram os mais adequados para o cultivo de células e assim proceder com os ensaios de cocultivo. Além disso, podemos notar também que as concentrações de 1 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de ANA as quais foram propostas por Divakaran e Babu (2009), não foram eficientes para a formação de calos friáveis no genótipo estudado. Seshadri e Janarthnam (2008) estudaram alguns protocolos de cultivo de *Vanilla* e a produção de calos e concluíram que a combinação de BAP e 2,4-D foi significativamente mais eficiente que a combinação de BAP e ANA e ANA e TDZ na indução de calos.

Gerra e Nodari (2006) apontam a auxina 2,4-D como a mais utilizada para a indução de calos e ainda tem efeito de supressão da morfogênese, e o picloran como indutor de calo com efeito comprovado apenas em monocotiledônia. Segundo os autores, reguladores podem ser utilizadas em concentrações que variam de 0,01 a 10 mg/L. Isto sugere que talvez neste experimento não tenha sido encontrada uma faixa

de combinações de concentrações diferentes destes reguladores para a planta estudada.

Com relação aos estudos de calogênese induzida pelo emprego de ANA e TDZ os melhores resultados foram obtidos nas combinações de 100 e 125 $\mu\text{L/L}$ de ANA e 56,25 $\mu\text{L/L}$ de TDZ (Tabela 2.5), entretanto, não foi possível obter calos friáveis apropriados para o cultivo celular (Figura 2.4).

Tabela 2.5 - Resultados da experiência de indução de calos utilizando diferentes combinações de ANA e TDZ.

Concentração de ANA ($\mu\text{L/L}$)	Concentração de TDZ ($\mu\text{L/L}$)	Resultados
75	32,75	-
	45	-
	56,25	-
100	32,75	-
	45	-
	56,25	+
125	32,75	-
	45	-
	56,25	+



Figura 2.4 – Calos de *Vanilla planifolia* crescendo em meio MS acrescido de 125 μ L/L de ANA e 56,25 μ L/L de TDZ.

4 CONCLUSÕES

A germinação e regeneração foi possível em meio MS básico e as plantas de *Vanilla planifolia* puderam ser propagadas em meio MS com 1 mg/L 6-benzilaminopurina (BAP) e 0.5 mg/L de ácido 3-Indolbutírico (AIB).

A manutenção da cultura de *Vanilla planifolia* foi possível em meio livre de regulador de crescimento por até 20 semanas em média.

Quanto à produção de calos da planta estudada, foi definida com a combinação de 100 e 125 μ L/L de ANA com 56,25 μ L/L de TDZ. As variações de combinação dos reguladores de crescimento BAP e ANA e ANA e TDZ testadas a partir dos protocolos sugeridos na literatura não foram eficientes para a formação de calos friáveis neste genótipo.

Com relação ao BAP e ANA, pode-se sugerir a combinação de 0,5 mg/L de BAP e 0,75 mg/L de ANA como as mais apropriadas para a formação de calos nesta espécie.

Há a necessidade de estudar combinações de outros reguladores como ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético (2,4,5-T), 4-CPA e picloran para a indução de calos em *Vanilla planifolia*, bem como testar concentrações superiores e inferiores às descritas na literatura de BAP, ANA e TDZ.

REFERENCIAS

- ABEBE, Z.; MENGESHA, A.; TERESSA, A.; TEFERA, W. Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in ethiopia. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8, p. 6817-6821, 2009.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Documento 58. 2002.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Documento 116. 2003.
- DIVAKARAN, M.; BABU, N. **Micropropagation and in *in vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews)**. Methods in molecular biology protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, vol. 547, 2009.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N.; NANDY, S. **Advances in micropropagation of selected aromatic plants: A review on Vanilla and Strawberry**. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. nº 1, Vol. 1, p. 1- 9, 2011.
- GEURRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Laboratório de fisiologia do desenvolvimento e genética vegetal - UFDGV. 2006.
- GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; WARD, O. P.; NARASU, M. L. Biotransformations using plant cell, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**. Vol. 19, p. 175-199, 2001.
- HRAZDINA, G. Aroma production by tissue cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 54, nº4, p. 1116-1123, 2006.
- JANARTHANAM, B.; SESHADRI, S. Planted regeneration leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In vitro*. **Cell Development Biology-Plant**, vol. 44, p. 84-89, 2008.
- KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; MURUGALATHA, N. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – a tropical orchid. **Current Science**, vol. 91, N° 10, 2006.

MULABAGAL, V.; TSAY, H-S. Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. **International Journal of Applied Science and Engineering**. Vol. 2, n° 1, p. 29-48, 2004.

NEELANNAVAR, V. S. ***In vitro* propagation studies on vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.)**. Thesis (Degree of master of Science Agriculture). University of Agricultural Sciences. Dharwad, 2006.

NJOROGE, A. M.; GITONGA, L.; MUTUMA, E.; MIMANO, L.; MACHARID, C.; WASILWA, L.; NULI, S.; KIURU, P. MUNGAI, A. Propagation of high quality planting materials of vanilla (*Vanilla planifolia*) through tissue culture. **National agricultural research laboratories**, 2007.

NETO, S. P. S.; ANDRADE, S. R. M. **Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações**.

POLDSTOLSKI, A.; FRENKEL-HAVLIN, D.; MALINOWSKI, J.; BLOUNT, J. W.; KOURTEVA, G.; DIXON, R. A. Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of vanilla orchid *Vanilla planifolia*. **Phytochemistry**. Vol. 61, p. 611-620, 2002.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N.; CARVALHO, D. C.; SANTOS, J. D.; GUERRA, E. P. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica, Ciência Agrária Ambiental**. Vol. 9, n° 2, p. 179-184, 2011.

TSURO, M.; KODA, M.; INOUE, M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. **Scientia Horticulturae**. Vol. 86, p. 81 - 88, 2000.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE VANILINA

1 INTRODUÇÃO

A vanilina pode é naturalmente obtida de favas de *Vanilla planifolia* Andrews. Contudo já se sabe que a extração de vanilina a partir da planta tem um baixo rendimento e este fator, aliado ao alto valor agregado da molécula, contribui em muito para busca por processos biotecnológicos de produção de vanilina que sejam viáveis economicamente. (Sinha, Verma e Sharna, 2007; Walton, Mayer e Narbad, 2003; Dausch e Pastore, 2005; e Pacheco e Damasio, 2010).

A produção biotecnológica da vanilina é em geral realizada por processos fermentativos. Esse termo, processos fermentativos, é utilizado para se referir a qualquer transformação intermediada por microrganismos através de uma sequência de reações bioquímicas. As fermentações vêm sendo empregada desde a antiguidade na fabricação de alimentos, tais como pão, cerveja, vinho, queijos e de aditivos como os aromas. Nos últimos cinquenta anos, houve um grande desenvolvimento destes processos, aplicados à produção de proteínas, enzimas, vitaminas, hormônios, bioaromas, antibióticos e outros, além do emprego de microrganismos no tratamento biológico de resíduos. (Serafini, Barros e Azevedo, 1996; Asenjo e Merchuk, 1994; Chisti e Moo-Young, 1987 e Chisti, 1989; Medeiros *et al.*, 2000 e Medeiros *et al.*, 2006).

Os processos fermentativos podem ser divididos em fermentação submersa, em estado sólido e/ou semissólido. As fermentações sólidas e semissólidas apresentam como vantagens sobre a submersa principalmente a maior produtividade volumétrica, maior concentração relativa de produto e menor geração de resíduos. Desta forma este processo mostra-se muito promissor. (Serafini, Barros e Azevedo, 2002; Pandey, Soccol e Larroche, 2007).

Os diferentes meios de cultura devem conter os nutrientes necessários para diversos microrganismos. Estes meios podem ser preparados no próprio laboratório com pó desidratado, ou adquiridos prontos no comércio em placas de Petri ou tubos de ensaio. Estes meios podem ser em caldo (líquido) ou ágar (sólido).

Boa parte dos trabalhos de investigação da produção de vanilina por via biotecnológica é feita a partir de fermentação microbiana e utiliza linhagens de microrganismos selvagens, mutantes ou geneticamente modificadas como *Pseudomonas resinovorans* SPR1, *Bacillus subtilis*, *Ameylatopsis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter* sp Px6-4 dentre muitas outras. Em sua maioria os processos são estudados com a utilização dos precursores ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol (Ashengroph *et al.*, 2011; Gurujeyalakshmi & Mahadevan, 1987; Overhage *et al.*, 2006; Gioia *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2008).

Em praticamente todos os trabalhos que envolvem produção, a determinação de compostos fenólicos de plantas utilizam duas técnicas cromatográficas como HPLC e GC-MS. Proestos *et al.* (2004) realizaram experimentos de determinação de compostos fenólicos em *Origanum dictamnus*, *Eucalyptus globulus*, *Origanum vulgare* L., *Melissa officinalis* L. e *Sideritis cretica* utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia gasosa com espectro de massa (GC-MS) e concluíram que com relação à determinação e identificação de compostos a metodologia GC-MS se mostrou mais eficiente, contudo com relação à reprodutibilidade a HPLC apresentou bons resultados.

A presença de vanilina e metabólitos relacionados produzidos em processos fermentativos é verificada utilizando cromatografia de camada delgada (TLC), papel, gasosa e líquida, sendo que as duas últimas podem ser ou não associadas à espectrometria de massa. Em todos os casos os autores puderam confirmar a presença das substâncias estudadas e na maioria das vezes até mesmo quantificá-las (Anwar, 1974; Sostaric *et al.*, 2000; Waliszewski, 2006; Goodner *et al.*, 2000; Shimoni *et al.*, 2000).

Um dos compostos utilizado como revelador para a vanilina em TLC é o ácido 2-tiobarbitúrico (TB). Neste caso as reações deste ácido com alguns tipos de moléculas já tem sido estudadas há muito tempo no emprego de análises de substâncias envolvidas nas questões de saúde humana, bem como nos estudos de aldeídos dos alimentos. As reações do TB com os aldeídos e produtos da oxidação

de lipídeos podem formar compostos de cor amarela, laranja e vermelha que são detectados em espectrofotômetro e são possivelmente derivados da formação de um aduto entre TB e os aldeídos. (Ashengroph *et al.*, 2011; Badcock *et al.*, 1997; Guzmán-Chozas, 1997; Kosugia e Kikugawab, 1985; Jardine *et al.*, 2002).

A ideia desta proposta partiu da necessidade se analisar uma quantidade relativamente grande de amostras geradas durante a realização de dos planejamentos experimentais (DCCR) para determinar as melhores condições de fermentação para a produção de vanilina para duas cepas microbianas *Bacillus subtilis* e *Amycolatopsis orientalis* utilizando três precursores (ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol). Neste trabalho apesar do planejamento experimental, foi gerado um total de 648 amostras o que tornou inviável a análise unicamente em HPLC.

Diante desta dificuldade nos baseamos no trabalho de Ashengroph *et al.* (2011) que utilizaram a cromatografia em camada delgada (TLC) para separar a vanilina e pulverizaram a placa de TLC com uma solução de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,1% em solução de HCl 2 M e testamos a possibilidade de detectar a vanilina nas amostras do caldo fermentado a fim de selecionar as amostras a serem analisadas em HPLC.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SOLUÇÕES

2.1.1 Preparo das soluções

Para realização das análises foram utilizados o ácido 2-Tiobarbitúrico (TB) Merck®, Vanilina 99%, Vanilina HPLC/UV Sigma-Aldrich®, eugenol, ácido ferúlico, isoeugenol e ácido clorídrico (todos foram preparados em água ultrapura produzida no próprio laboratório).

As soluções padrão de vanilina, para o espectro de absorbância em placas de 96 poços, foram preparadas com vanilina HPLC/UV diluídas em água ultra pura nas concentrações de 0,01 g/L, 0,025 g/L, 0,05 g/L, 0,075 g/L e 0,1 g/L.

A solução de ácido 2-tiobarbitúrico em HCl (TB-HCl) foi preparada através da solubilização de TB a 0,1% em HCl 2M conforme descrito por Ashengroph *et al.*, (2011).

As concentrações de vanilina (0,01; 0,025; 0,05; 0,075 g/L) utilizadas neste trabalho foram assim determinadas, para tornarem possíveis as análises em HPLC e a posterior correlação entre as absorbâncias e as áreas dos picos em HPLC. Nas condições de reação (100 °C por 30 minutos e resfriamento à temperatura ambiente) foram realizadas análises das mesmas curvas padrão de vanilina por HPLC de forma a se obter a correlação entre o método de análise por HPLC (já padronizado) e o método espectrofotométrico em estudo.

2.2 ANÁLISE

2.2.1 Leitura em espectrofotômetro

A fim de verificar se havia diferença entre as proporções das soluções de TB-HCl e dos padrões de vanilina na mistura, as reações foram realizadas inicialmente em três placas de 96 poços TPP® com diferentes proporções de TB-HCl e as soluções padrão de vanilina em 8 replicatas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Proporções testadas de solução TB-HCl: Padrões de vanilina.

Placas	1	2	3
TB-HCl µ/L	200	150	100
Padrão vanilina µ/L	100	100	100

Com o objetivo de verificar a influência da temperatura e do tempo de reação, após a adição das soluções uma placa foi deixada na temperatura ambiente 21°C ±

2, uma foi colocada em estufa a 37 °C e a outra foi colocada em estufa a 100 °C, sendo as duas últimas condições baseadas no trabalho Jardine *et al.* (2002). Um lote de 8 amostras de cada placa foi retirado, imediatamente após a adição das soluções (tempo inicial) e os outros foram retirados a cada 30 minutos para leitura depois do resfriamento à temperatura ambiente. A varredura de espectro foi feita em leitor espectrofotométrico Biotek Power Wave XS.

O tempo total da reação foi de 6 horas e foram obtidos os dados da absorbância, o pico de absorbância, o melhor comprimento de onda e o gráfico do espectro de absorbância conforme adaptado de Jardine *et al.* (2002) e todas as amostras foram deixadas para esfriar a temperatura ambiente.

2.2.2 Análise em HPLC

As análises em HPLC foram feitas utilizando fase móvel composta de uma fase A (com água acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v)) e acetonitrila a 10% (v/v) e uma fase B (com água acidificada e acetonitrila a 35% (v/v)) adaptada de Overhage *et al.* (2006). O tempo de corrida foi de 30 min e a detecção foi feita em comprimento de onda de 270 nm.

2.2.3 Correlação Espectrofotômetro X HPLC

Foram feitas curvas de vanilina nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 g/L, utilizando a água, meio de cultivo MS constituído apenas de sacarose 20 g/L, peptona 5 g/L, Soluções de micronutrientes 5 ml/L e sem as soluções de nitrato de amônia, nitrato de potássio e de macronutrientes (MS modificado) e o meio de cultivo Yeast Medium (YM).

Os meios de cultivo MS modificado e YM foram analisados antes da fermentação e após 96 horas, conforme o melhor tempo de produção de vanilina nos experimentos. Os meios não fermentados e fermentados foram analisados sem a presença de vanilina ou qualquer precursor e em outro grupo de testes foram analisados com adição de vanilina nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 g/L.

A fim de analisar os possíveis interferentes na reação no caso dos meios de cultivo foram realizados testes com o meio MS modificado para sacarose, peptona e soluções de sais (E) e (C) que compõem o meio. A mesma verificação de interferência

foi realizada para os precursores, ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol, bem como para o etanol, porém neste caso em água.

Durante a otimização do processo de produção de vanilina por uma cepa bacteriana isolada em meio MS modificado que teve suas concentrações de sacarose variando entre 1,0 e 20,0 g/L.

Pode-se realizar testes de interferência nas diversas situações com o meio antes da fermentação e depois de 120 horas de fermentação conforme tempo de melhor produção de vanilina, bem como produzir uma curva de correlação entre concentrações de vanilina determinadas a partir das leituras de absorbâncias do método espectrofotométrico em teste, e as determinadas por HPLC.

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1 MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE VANILINA

3.1.1 Determinação das condições de análise

A reação da solução padrão de vanilina com o ácido 2-tiobarbitúrico apresentou um composto de cor amarela de intensidade proporcional ao aumento da concentração, conforme ilustrado na figura 3.1 linha A. O mesmo não ocorreu quando se manteve a concentração da vanilina e aumentou-se o volume de ácido no recipiente de reação nem com os ensaios feitos com ácido ferúlico, eugenol, isoeugenol, etanol grau HPLC e água. Em seu trabalho Ashengroph *et al.* (2011) utilizando o ácido 2-tiobarbitúrico para revelar vanilina em TLC também puderam verificar a formação de cor amarela na placa de cromatografia.

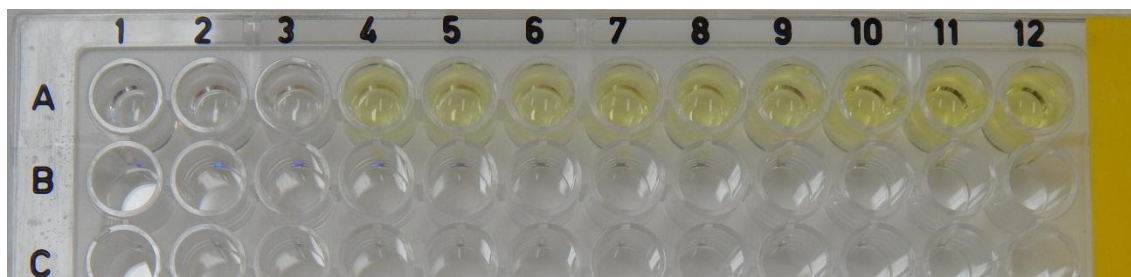


Figura 3.1 – Formação de composto colorido na reação da vanilina com o ácido 2-tiobarbitúrico em água. Na linha A colunas de 1 – 12 concentrações, em triplicatas, poços de 1 a 3 0,01 g/L; poços de 4 a 6 0,05 g/L; poços de 7 a 9 0,075 g/L e poções de 10 a 12 0,1 g/L.

O comprimento de onda onde houve máxima absorção para leitura do composto amarelo formado a partir da reação entre a vanilina e o ácido 2-Tiobarbitúrico em solução aquosa foi de 432nm segundo espectro de absorbância (Figura 3.2).

As condições de temperatura e tempo de reação para uma concentração de 0,5 g/L de vanilina estão representadas no gráfico 3.1.

Sob a temperatura ambiente monitorada ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) não houve correlação entre a formação de cor e a concentração da vanilina na solução. As melhores temperaturas de reação foram $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ onde houve a formação da cor com intensidade correspondente às concentrações de vanilina na solução e também uma considerável estabilidade na curva ao longo do tempo (Gráfico 3.1). Sendo que a temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi estabelecida como a melhor por apresentar maior estabilidade de reação durante todo o tempo com relação à temperatura ambiente e de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, além de que vários autores reportam estudos das reações com TB a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kosugi e Kikugawa, 1985; Kosugi *et al.*, 1987; Buttkus e Bose, 1972).

O tempo de reação foi estabelecido em 30 minutos, o menor tempo possível para formação dos compostos coloridos e que não apresentou diferença significativa dos demais tempos (Gráfico 3.1).

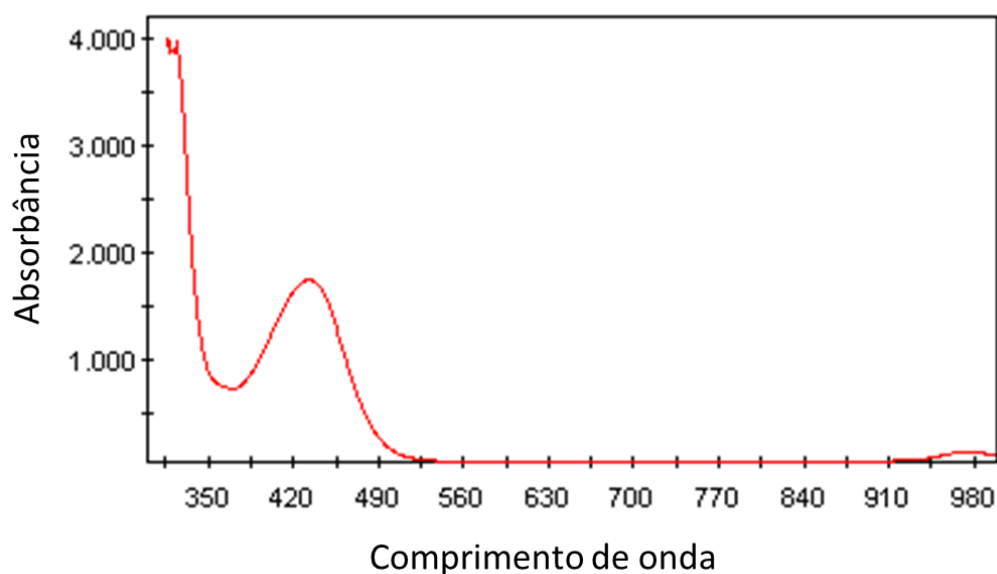


Figura 3.2 – Varredura de espectro para determinação do melhor comprimento de onda para leitura do composto formado na reação do ácido tiobarbitúrico com o fermentado contendo vanilina.

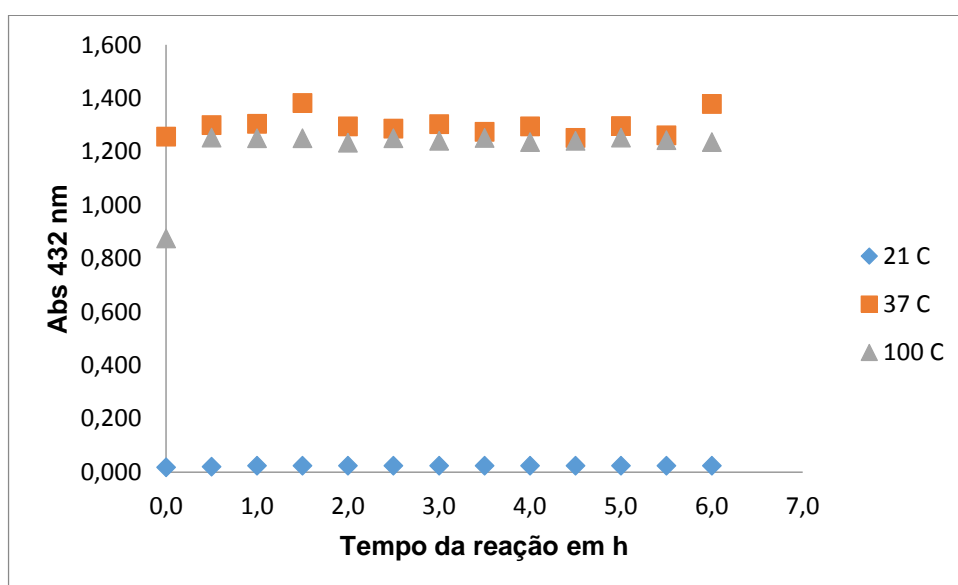


Gráfico 3.1 – Absorbâncias observadas para a reação do ácido 2-tiobarbitúrico com vanilina (0,5 g/L) durante o tempo durante um período de 6 horas em diferentes temperaturas.

3.1.2 Correlações absorbâncias X áreas de picos do HPLC

Correlação de detecção para limite mínimo de detecção A curva de correlação entre as leituras espectrofotométricas e as análises cromatográficas das soluções

padrão de vanilina em água apresentou um R^2 de 0,9823 (Figura 3.2), um R^2 de 0,9965 (Figura 3.3) para o meio MS modificado e um R^2 de 0,9545 (Figura 3.4) para o meio YM, os resultados demonstram a boa correlação entre o método colorimétrico e a área do pico do HPLC, sendo desta forma possível afirmar que o método é adequado para verificar a presença de vanilina nestas soluções em diferentes concentrações.

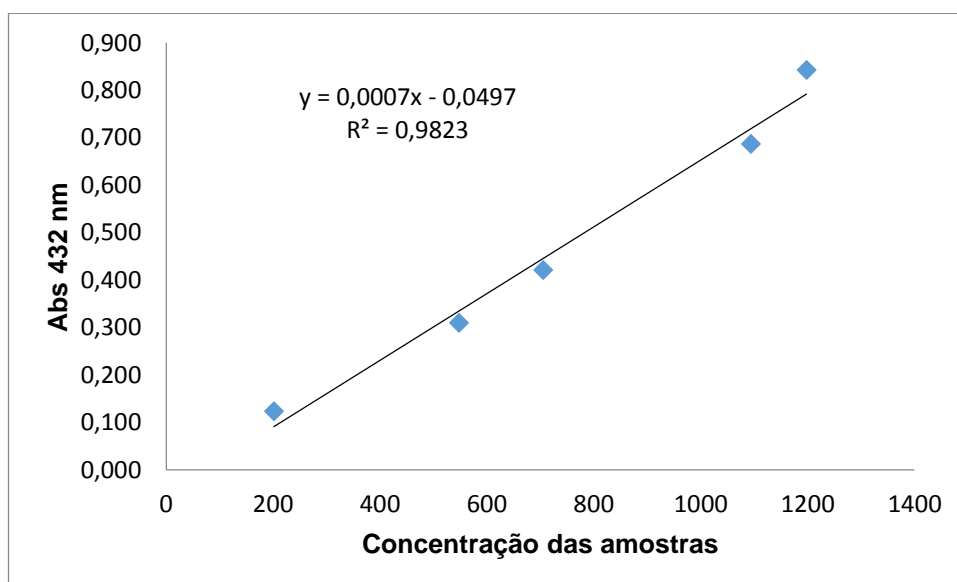


Gráfico 3.2 – Curva de correlação entre as áreas dos picos cromatográficos e as absorvâncias das leituras das soluções padrões de vanilina nas concentrações de 0,01 g/L, 0,025 g/L, 0,05 g/L, 0,075 g/L e 0,1 g/L.

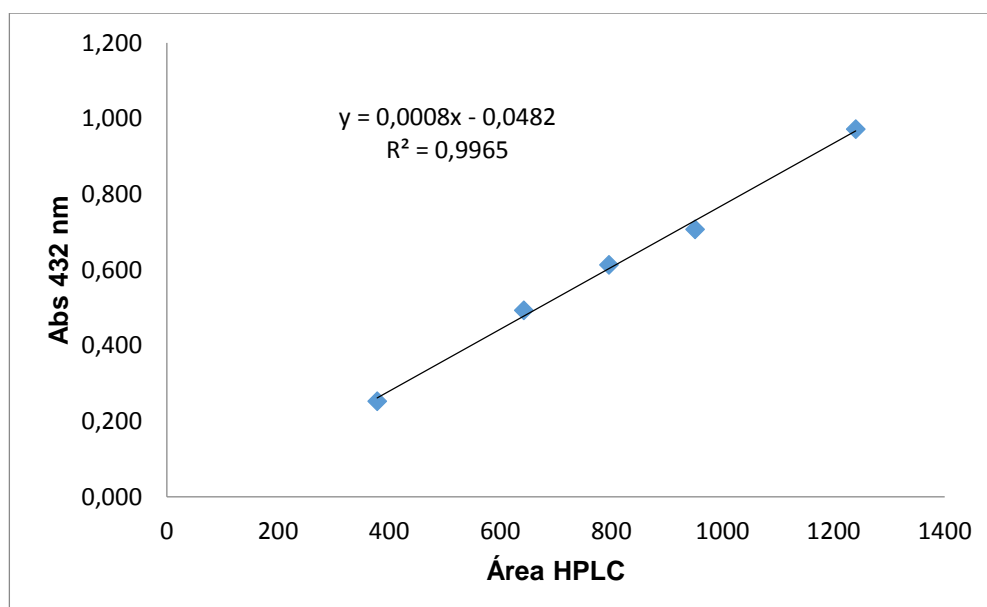


Gráfico 3.3 – Curva de correlação entre as áreas dos picos cromatográficos obtidos por HPLC e as absorvâncias das leituras da vanilina nas concentrações de 0,01 g/L, 0,025 g/L, 0,05 g/L, 0,075 g/L e 0,1 g/L.

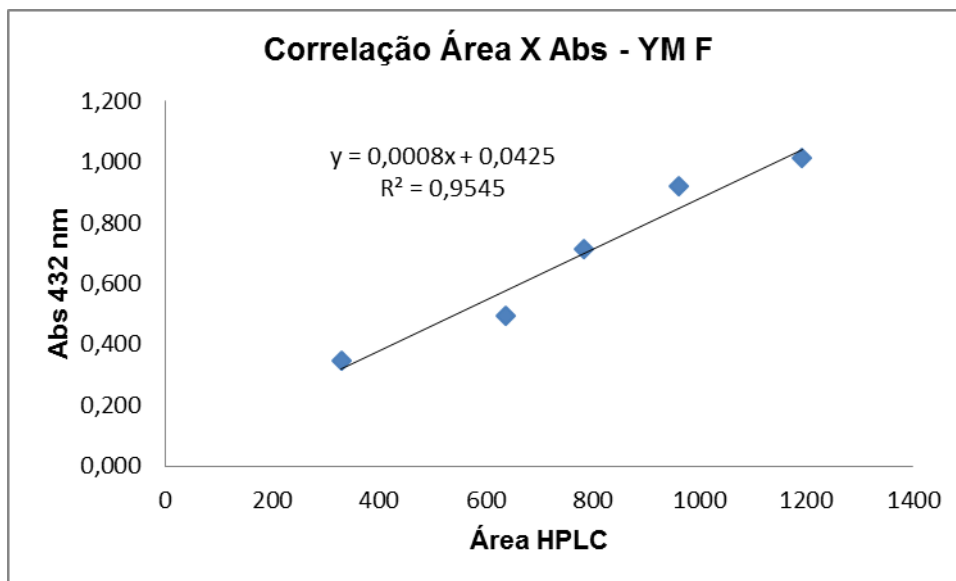


Gráfico 3.4 – Curva de correlação entre as áreas dos picos cromatográficos e as absorvâncias das leituras da vanilina nas concentrações de 0,01 g/L, 0,025 g/L, 0,05 g/L, 0,075 g/L e 0,1 g/L.

No caso do meio fermentado durante 96 horas tanto para o MS modificado quanto para o YM foi possível constatar a presença de interferentes na formação da cor. Contudo, o método pode detectar a presença de vanilina quando estes meios foram dopados com diferentes concentrações de vanilina, visto que houve correlação entre as concentrações da vanilina e as absorvâncias a partir de 0,025 g/L de vanilina (gráficos 3.3 e 3.4).

A partir destes testes com os meios dopados percebe-se que o método apresenta um limite de detecção próximo de 0,025 g/L pois em concentrações abaixo destas no caldo fermentado, não foi possível estabelecer uma boa correlação entre os valores de absorvâncias do método e as áreas dos picos do HPLC.

Quanto a capacidade do método de determinar a concentração de vanilina no caldo fermentado por três cepas isoladas as quais foram denominadas M1, M2 e M3, Os valores encontrados não corresponderam ao que estava sendo determinado pelas análises em HPLC mais a concentração adicionada na dopagem (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Relação entre as concentrações de vanilina em meio MS modificado dopado obtidas por HPLC+dopagem e pelo método colorimétrico.

Cepas	Concentração por HPLC (g/L)	Concentração vanilina na dopagem (g/L)	Concentração por espectrofotômetro (g/L)

M1	0,012	0,05	0,035
M2	0,022	0,05	0,04
M3	0,016	0,05	0,031

A partir destes resultados pode-se dizer que o método detecta a presença de vanilina e ainda indicar quais amostras contém uma concentração maior de vanilina, porém não podemos afirmar que ele pode ser utilizado para determinar a concentração exata da molécula presente no caldo fermentado, ou seja, este é um método qualitativo para meios fermentados, mas não sendo quantitativo.

Os resultados das fermentações com a cepa isolada M2 mostraram que há uma considerável correlação entre as concentrações determinadas pelo método colorimétrico e as concentrações determinadas pelas análises em HPLC (Gráfico 3.6).

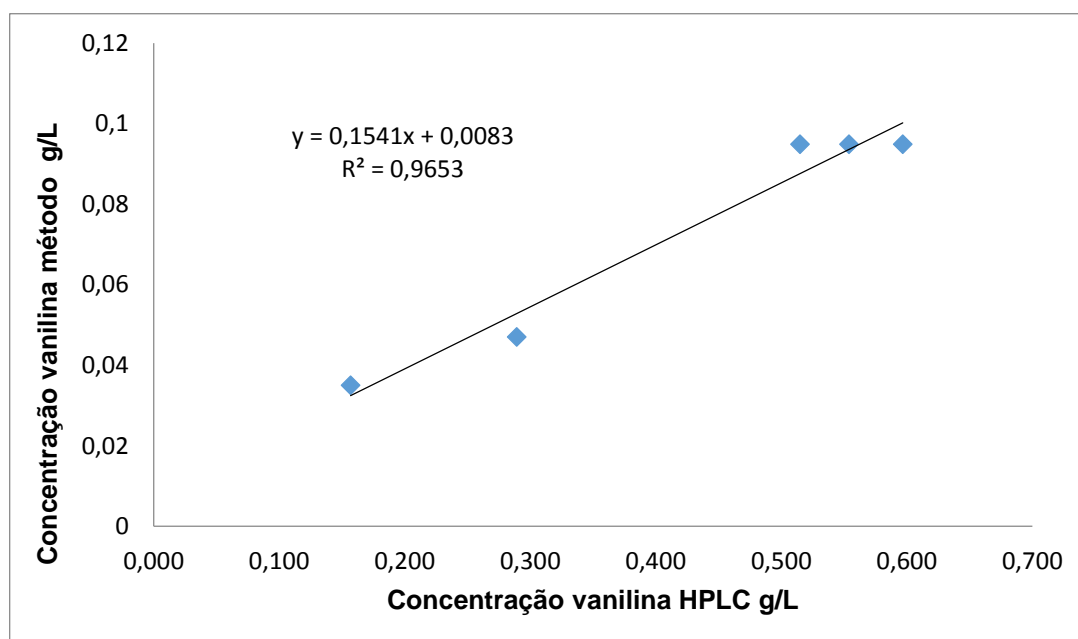


Gráfico 3.6 – Curva de correlação entre as concentrações de vanilina no meio MS modificado analisadas pelo método e por HPLC.

Contudo ficou evidente que não é possível determinar a concentração real de vanilina no meio utilizando o método colorimétrico, pois os valores de concentrações encontrados quando da utilização do mesmo para analisar o fermentado são inferiores aos encontrados nas análises por HPLC.

3.1.3 Interferentes

Os testes de interferência foram feitos para os precursores ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol, assim como para os componentes dos meio de cultivo MS modificado, os quais são sacarose, peptona soluções de micronutriente (C e E).

Os resultados obtidos nos testes de interferentes mostraram que apenas a sacarose se apresenta como um possível interferente na formação do composto colorido, pois os valores de absorbância encontrados a partir das reações feitas entre o meio MS modificado, não fermentado, com diferentes concentrações de sacarose apresentaram boa correlação com as concentrações desta no meio MS modificado utilizado durante a otimização do processo de produção de vanilina por uma cepa isolada M2 (gráfico 3.6). Para os demais interferentes não houve formação de cor.

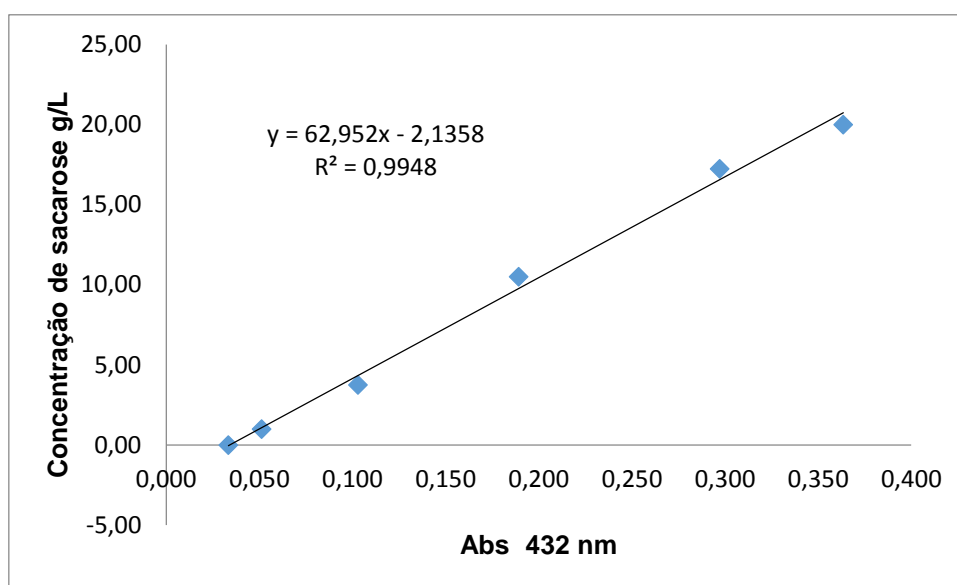


Gráfico 3.6 – Curva de correlação entre as concentrações de sacarose no meio MS modificado e os valores de absorbância do método proposto para detecção de vanilina.

A formação deste composto amarelo em reações com TB também foi verificada por outros autores que utilizaram o ácido 2-tiobarbitúrico para estudos de lipídeos em humanos, animais e de aldeídos em alimentos. Jardine *et al.* (2002) também estudaram a natureza da reação do ácido tiobarbitúrico através de análise por LC-MS e MS-MS para determinar as concentrações de malondilaldeído (MDA) e concluíram que o método é uma importante ferramenta para tais estudos, mas

recomendaram maiores estudos a fim de analisar outros intermediários incolores que poderiam estar presentes na solução analisada. Estes autores encontraram além do composto de coloração rosa formado pela reação TBA:MDA um de coloração amarela que eles sugerem ser um composto instável e que tem origem na reação de aldeídos saturados, embora seja também formado a partir da reação do ácido tiobarbitúrico com ácido fórmico a 80 ° C durante 1 hora.

Nair *et al* (1984) já haviam realizado estudos para elucidar a reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com malonaldeído (MDA) produto que indica a peroxidação de lipídios, para determinação das concentrações dos lipídios oxidados em investigações de saúde humana e concluíram que a formação de adutos entre TBA:MDA provavelmente iniciada pelo ataque nucleofílico envolvendo o carbono-5 de TBA e o onto-carbono de um MDA, seguido por desidratação e uma reação similar subsequente com formação de um aduto intermediário com uma segunda molécula de TBA e esta reação formou tanto o composto amarelo como em nossos estudos quanto composto laranja.

4 CONCLUSÕES

O método colorimétrico sugerido mostrou-se eficiente para determinar a presença e as concentrações de vanilina em soluções padrão;

O melhor comprimento de onda para leitura do composto amarelo formado na reação foi de 432 nm.

Para os caldos fermentados o método foi observar uma correlação entre as concentrações de vanilina, a partir de 0,25 g/L. Mas não para determinação da concentração exata da mesma;

Estudos adicionais mais detalhados para determinar a possível ação de interferentes na reação do ácido tiobarbitúrico nos meios fermentados.

REFERÊNCIAS

- ANWAR, M. H. Paper chromatography of monohydroxyphenols in vanilla extract. **Analytical Chemistry**, vol. 35, N° 12, 1963.
- ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHONI, H.; MOMENBEIK, F. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potencial of

transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. **New Biotechnology**. Vol. 28, n° 6, 2011.

ASENJO, J. A.; MERCHUK, J. C. **Bioreactor System Design**. Marcel Dekker, Inc. 1994.

BADCOCK, N. R.; ZOANETTI, G. D.; MARTIN, E. S. **Ensaio nonchromatographic para adição de ácido Malondialdeído-tiobarbitúrico com HPLC equivalência**. Associação Americana de Química Clínica. 1997.

BARROS N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas, SP: Unicamp, 1996.

BUTTKUS, H.; BOSE, R. J. Amine-Malonaldehyde Condensation Products and Their Relative Color Contribution in the Thiobarbituric Acid Test. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Vol. 49, p. 440 – 443, 1972.

CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. **Airlift reactors**: characteristics, applications and design considerations. Chem. Eng. Commun. Vol. 60, p. 195-242, 1987.

CHISTI, M. Y. **Air-Lift Bioreactors**. Elsevier. New York, 1989.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Production of vanillin: A biotechnological opportunity. São Paulo, **Química Nova**, vol. 28, N° 4, 2005.

GIOIA, D. D.; LUZIATELLI, F.; NEGRONI, A.; FICCA, A. G.; FAVA, F.; RUZZI, M. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. **Journal of Biotechnology**, vol. 156, p. 309-316, 2011.

GOODNER, K. L.; JELLA, P.†; ROUSEFF, R. L. Determination of vanillin in orange, grapefruit, tangerine, lemon and lime juices using GC-Olfactometry and GC-MS/MS. **Journal of Agricultural Food Chemical**, vol. 48, p. 2882-2886, 2000.

GURUJEYALAKSHMI, G.; MAHADEVAN, A. Dissmilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*. **Current Microbiology**. Vol. 16, p. 69-73, 1987.

GUZMÁN-CHOZAS, M.; VICARIO, I. M.; GUILLÉN-SANS, R. Spectrophotometric Profiles of Off-Flavor Aldehydes by Using Their Reactions with 2-Thiobarbituric Acid. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 45, p. 2452 – 2457, 1997.

JARDINE, D.; ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) investigation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 50, p. 1720-1724, 2002.

KOSUGI, H.; KIKUGAWA, K. Thiobarbituric Acid Reaction of Aldehydes and Lipids in Glacial Acetic Acid. **LIPIDS**, Vol. 20, n° 12, 1985.

KOSUGI, H.; KATO, T.; KIKUGAWA, K. Formation of Yellow, Orange, and Red Pigments in the Reaction of Alk-2-enals with 2-Thiobarbituric Acid. **Analytical Biochemistry**, Vol. 165, p. 456-464, 1987.

LI, X.; YANG, J.; LI, X.; GU, W.; HUANG, J.; ZHANG, K.-Q. The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter* sp Px6-4 isolated from *Vanilla* root. **Process Biochemistry**. Vol. 43, p. 1132-1137, 2008.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; RENATO, C. R.; FREITAS, J. S.; CHRISTENC, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. Vol. 6, p. 33 – 39, 2000.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PASTORE, G. M.; SOCCOL, C. R. Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. **Food Technol. Biotechnol.** Vol. 44, n° 1, p. 47– 51, 2006.

NAIR, V.; TURNER, G. A. The Thiobarbituric Acid Test for Lipid Peroxidation: Structure of the Adduct with Malondialdehyde. **LIPIDS**, Vol. 19, n°. 10, 1984.

OVERHAGE, J.; STEMBUCHEL, A.; PRIEFERT, H. Harnessing eugenol as a substrate for production of aromatic compounds with recombinant strains of *Amycolatopsis* sp. HR167. **Journal of Biotechnology**, Vol. 125, p. 369-376, 2006.

PACHECO, S. M.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, propriedades e produção. **Química Nova**, vol. 32, N° 4, 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation. **Asiatech Publishers**, Inc. New Delhi, 517 p., 2007.

PROESTOS, C. **Analysis of phenolic compounds in aromatic plants**. p.403-414, 2004.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS. Caxias do Sul, 433 p., 2002.

SHIMONI, E.; RAVID, U.; SHOLAM, Y. Isolation of a *Bacillus* sp capable of transforming isoeugenol to vanillin. **Journal of Biotechnology**. Vol 78, p. 1-9, 2000.

SINHA, A. K.; VERMA, S. C.; SHARMA, U. K. Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. **Journal of Separation Science**, vol. 30, p. 15-20, 2007.

SOSTARIC, T.; BOYCE, M. C.; SPICKET, E. E. Analysis of the components in vanilla extracts and flavorings by solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, vol. 48, p. 5802-5807, 2000.

WALISZEWSKI, K. N.; PARDIO, V. T.; OVANDO, S. L. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. **Food Chemistry**, vol 101, p. 1059-1062, 2006.

WALTON, N.; MAUER, M. J.; NARBAD, A. Molecules of interest vanillin.
Phytochemistry, vol. 63, p. 505-515, 2003.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE VANILINA POR MICRORGANISMOS ISOLADOS

1 INTRODUÇÃO

O isolamento e a seleção de microrganismos é um processo fundamental e em determinados casos o ponto de partida para os trabalhos em biotecnologia. Diversas formas de selecionar e isolar os microrganismos podem ser empregadas de acordo com o propósito do trabalho, já que os microrganismos podem ser isolados dos mais diversos lugares. Júnior (2009) realizou um trabalho onde utilizou nódulos da planta de guandu (*Cajanus cajan* L. Mill sp) para o isolar as cepas a serem estudados na produção de biopolímeros. Os nódulos foram inoculados em placas contendo os meios de cultura adequados.

Microrganismos podem ser isolados também do interior de plantas e seu potencial na degradação de agentes poluidores como hidrocarbonetos pode então ser analisada como no caso do trabalho de Oliveira (2009), que isolou espécies endofíticas em ágar nutriente a partir de segmentos de raízes de plantas coletadas em regiões contaminadas com lama asfáltica.

Uma diversidade considerável de trabalhos apresentando isolamento de microrganismos em diferentes condições já pode ser vista, como o isolamento de fungos endofíticos de *Annona squamosa* L. para utilização na produção de mudas de pinha (Silva *et al.*, 2006), identificação e isolamento de bactérias lácticas de polpa de café (Pagnocelli, 2001), fungos filamentosos produtores de lipases isolados de materiais gordurosos e amostras de solo (Colen, 2006) e na avaliação do potencial de leveduras produzir biossurfactantes usando fontes alternativas de carbono (Accorsini 2010).

Na tentativa de desenvolver a produção biotecnológica de vanilina Gurujelakishmi e Mahadevan (1987) isolaram uma linhagem de *Bacillus subtilis* de solo de floresta e testaram sua habilidade em biotransformar ácido ferúlico em vanilina. Em 2000, Shimoni *et al.*, também isolaram uma espécie de *Bacillus* cultivando-a em meio com adição de isoeugenol e estudaram sua bioconversão de isoeugenol em vanilina. Mais recentemente Ashengroph *et al.* (2011a) isolaram

Pseudomonas resinovorans linhagem SPR1, cultivando bactérias provenientes de amostras de solos de diferentes regiões em meio YMC na presença de eugenol.

Uma das formas de analisar a ação inibitória de determinada substância sob o crescimento de microrganismos e consequentemente selecionar cepas tolerantes a tais compostos é o acompanhamento da quantidade de biomassa formada na presença da mesma (Raggi, 2008; Overhage *et al.* 2006; Scherer *et al.* (2009).

A busca por um processo biotecnológico eficiente e economicamente viável de produção de vanilina por fermentação microbiana tem sido alvo de constantes estudos sobre a elucidação das questões relacionadas à bioquímica, genética e condições de cultivo em todas as partes do mundo. Segundo Walton *et al.* (2003) menos de 1% de toda vanilina produzida no mundo é originária da orquídea do gênero *Vanilla*, dado confirmado também por Converti *et al.* (2010). Segundo estes autores este fato faz com que esta molécula tenha um alto valor de mercado, estimulando a corrida na tentativa de estabelecimento deste processo. Estes autores também ressaltam a vanilina como uma das mais importantes moléculas aromáticas consumida no mundo.

Diversos trabalhos têm apresentado estratégias e estudos com microrganismos mutantes como Overhage *et al.* (1999) que trabalharam com um mutante de *Pseudomonas* sp HR199 para biotransformar eugenol em vanilina. Overhage *et al.* (2006) utilizaram uma linhagem de *Amycolatopsis* sp HR167 transformada com plasmídeo produzido em *E. coli* para estudar a produção de vanilina a partir de eugenol e isoladas do ambiente. Li *et al.* (2008) isolaram uma cepa de *Enterobacter* sp Px6-4 e verificaram sua habilidade em converter ácido ferúlico em vanilina. Zhang *et al.* (2006) estudaram o metabolismo do *Bacillus subtilis* HS8 na presença de isoeugenol utilizando concentrações de precursores de 8,8 g/L após 24 horas de fermentação.

Este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar microrganismos tolerantes à vanilina, bem como Estudar as condições de cultivos de microrganismos para a produção desta molécula.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 MICRORGANISMOS

As etapas do estudo referentes ao isolamento, seleção e cultivo microbiano estão representadas no fluxograma 4.1.

2.1.1 Isolamento de microrganismos

Uma cepa bacteriana foi isolada do meio de cultivo *in vitro* da *Vanilla planifolia*, no qual se notou o desenvolvimento de uma cepa de microrganismo contaminante (Figura 4.1). Posteriormente outras três cepas foram isoladas de sementes de *Dipteryx odorata* (cumarú) e utilizadas em testes para produção de vanilina.

Para a cepa isolada do meio de cultura de *Vanilla planifolia* procedeu-se o estabelecimento do cultivo, a identificação e os estudos de produção de vanilina.

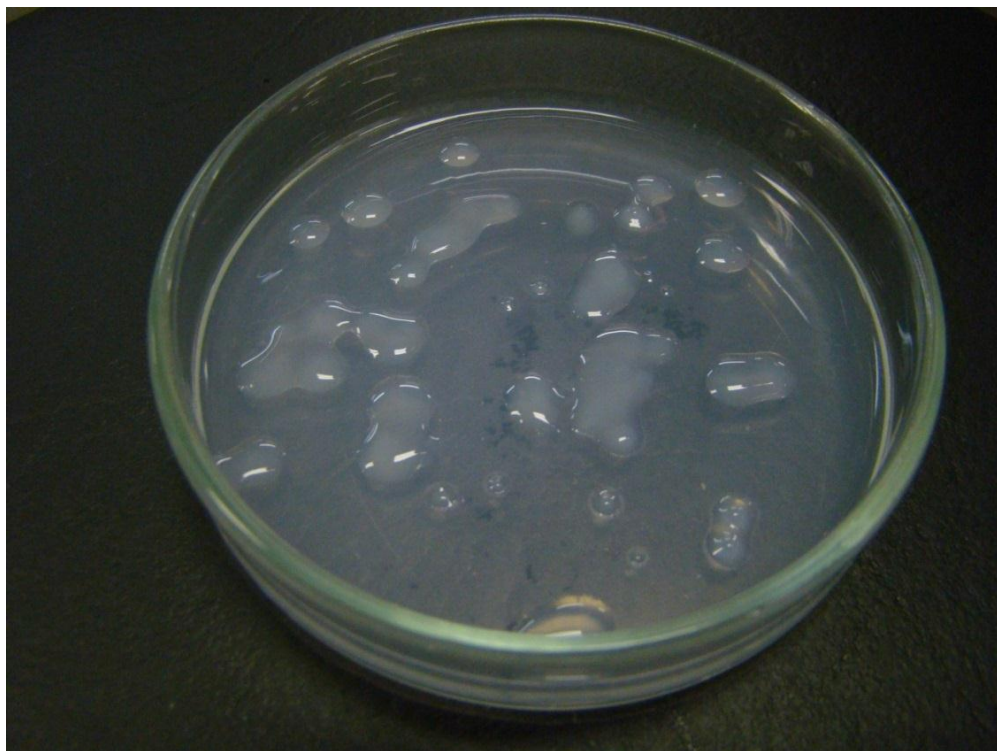


Figura 4.1 – Colônias bacterianas com aspecto mucoide de microrganismo isolado no meio de cultura da orquídea *Vanilla planifolia*.

2.1.2 Isolamento de microrganismos da superfície da semente de *Dipteryx odorata* (cumaru)

Visando obter cepas resistentes à presença de vanilina e precursores foram utilizadas sementes provenientes do comércio local de Belém do Pará, região amazônica no norte do Brasil de *D. odorata* (planta conhecida também pelo nome de baunilha do Amazonas) para o isolamento dos microrganismos.

As sementes foram incubadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura YM e Caldo Nutriente (CN) separadamente. Os frascos com os respectivos meios foram colocados em shaker por 72 horas a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e uma agitação de 120 rpm.

Uma alíquota de 100 mL do meio fermentado contendo os microrganismos que cresceram foram então transferidos com micropipeta automática para quatro frascos com meios novos, dois com YM e dois com CN, acrescidos de vanilina e eugenol a uma concentração de 5 g/L, em solução alcoólica e mais dois sem o acréscimo de qualquer solução. Os meios inoculados com os microrganismos foram incubados novamente nas mesmas condições já citadas acima.

Depois das 72 horas de fermentação uma alíquota de 100 μL de cada meio foi coletada e espalhada em placas de Petri contendo os respectivos meios sendo que foram preparadas placas com meio CN mais vanilina e CN mais eugenol e da mesma forma foi feito para o YM. Uma parte destas placas continha 1 mL de solução com vanilina a 5 g/L e outra com 1 mL de eugenol a 5 g/L. Um terceiro conjunto de placas com YM e agar nutriente foi utilizado como controle, o material foi espalhado na superfície do meio com uma alça de Drigalski.

As placas foram incubadas $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. A partir destes cultivos isolou-se distintas colônias com uma alça de platina e transferiu-se para placas pela técnica de esgotamento. As colônias crescidas isoladamente foram cultivadas em meios CN e YM para que se procedesse as diluições. As diluições foram feitas em uma série até 10^{-10} e de cada uma retirou-se uma alíquota de 100 μL para

espalhamento em placas. As placas foram novamente incubadas a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 24 horas e depois realizou-se a identificação microscópica com coloração de Gram e as cepas foram então transferidas para erlenmeyers com meio CN e incubadas em shaker por 24 h a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com agitação de 120 rpm para cultivo e posterior conservação em tubos com agar inclinados e glicerol 10%.

A viabilidade celular também foi determinada a partir das diluições feitas para cada cepa isolada.

2.1.3 Aquisição da cepa *Amycolatopsis orientalis*

A cepa *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806, foi adquirida do Banco japonês Nite Biological Resource Center-NBRC. Esta cepa foi reativada conforme recomendações do banco e então passou a ser cultivada em meio YM a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 120 rpm em shaker. A curva de crescimento, a correlação entre biomassa e densidade óptica e a viabilidade celular foram determinados conforme descrito em 2.5.

2.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS ISOLADAS DO MEIO DE CULTIVO DE *Vanilla planifolia*

O microrganismo isolado foi cultivado em meio MS modificado e incubados a 29°C durante 24 h e armazenados em freezer até a extração do DNA. O método utilizado foi o de extração por fenol clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989), com auxílio de pérolas de vidro. Antes do uso, as pérolas de vidro foram limpas com ácido clorídrico 1N, enxaguadas com água ultrapura e o material orgânico incinerado overnight em mufla a 270°C .

Inicialmente as bactérias caracterizadas como Gram-positivas foram lavadas duas vezes com tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) e solubilizadas em um volume de 500 μL de tampão de lise que consistiu em 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM EDTA pH 8,0. O rompimento da parede celular foi realizado por método físico, com cisalhamento causado pelas pérolas de vidro em agitação contínua de 3 minutos em *Vortex* na agitação máxima. Além disto, as bactérias foram solubilizadas em solução com 0,5% SDS, que consistiu no método

químico detergente auxiliar para lise celular. A precipitação do DNA a partir da fase aquosa foi feita com adição de acetato de sódio pH 5,2 e adição de etanol absoluto refrigerado a -20°C, a centrifugação foi de 18.000 x g por 30 minutos a 4°C. Foi feita uma lavagem com etanol 70%. A velocidade de centrifugação foi de 18.000 x g por 15 minutos a 4°C. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, sendo considerada a absorbância de 1,00 como 1 ng/μL de DNA na frequência de 260 nm (Stephenson, 2010).

2.2.1 Amplificação da região 16s rDNA

Os iniciadores universais utilizados para as bactérias foram o F27 (5'- AGRGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') e R1492 (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') (LANE, 1991).

Estes iniciadores foram utilizados para amplificar uma sequência de aproximadamente 1,4-kB da região codificadora do 16S rDNA em volumes de reação de 25 μL com 0,5 μL de DNA molde na concentração de 10ng de DNA. As concentrações finais dos reagentes foram: 1x PCR *buffer*, MgCl₂ (Invitrogen), 200 μM de cada dNTP (Invitrogen), 300 pM de cada um dos iniciadores *forward* e *reverse* (Invitrogen), 1 μg/μL de BSA 0,04 μg/μL como coadjuvante (Sigma-Aldrich), e 1.25 U Taq DNA polymerase (Invitrogen).

Todas as reações foram realizadas em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*) com desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos em seguida a reação em cadeia da polimerase realizou-se com 26 ciclos de desnaturação (95° C por 30 s), anelamento (53° C por 25 s) e extensão (72° C por 2 minutos), seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em um gel de agarose 1,5% com o marcador de massa molecular 1kB (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia).

A duplicata preparada para atingir os 45 μL de produto de PCR utilizados na etapa de purificação foi feita após ter as condições estabelecidas na primeira vez.

2.2.2 Purificação de DNA para reação de sequenciamento

Os produtos de amplificação foram purificados com precipitação por acetato de amônio e armazenados a -20° C. Consistiu em adicionar e homogeneizar em vortex 45 µL do produto de PCR em tubo de 500 µL, seguido de 30 µL de acetato de amônio 7,5 M (esterilizado por filtração) e 90 µL de etanol absoluto. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente, com descarte do sobrenadante usando micropipeta e colocando a ponteira do lado oposto ao *pellet*. Em seguida foram adicionados lentamente 200µL de etanol 70%, que foi descartado após centrifugação a 13.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. O material amplificado foi seco em estufa à vácuo a 45°C (10-15 min) e então dissolvido em 20 µL de água ultrapura. Foi realizada eletroforese em gel de agarose com 3 µL do DNA purificado para avaliação da eficiência do procedimento de purificação e subsequente envio para reação de sequenciamento.

2.2.3 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 4,5 pmol ou do *primer* F27 (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') ou do *primer* R1492 (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') e 3 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File*

“DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; *BioLIMS Project* “3100_Project1”; *Run Module* 1 “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e *Analysis Module* 1 “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

2.3 MEIOS PARA CULTIVO MICROBIANO

2.3.1 *Bacillus subtilis*

A bactéria *B. subtilis* isolada e identificada (item 2.2), foi cultivada em meio MS modificado a uma temperatura de $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e agitação de 120 rpm. As curvas de correlação D.O. x Biomassa destas cepa foram feitas conforme os procedimentos descritos no item 2.5.

2.3.2 Cultivo das cepas isoladas

As bactérias M1, M2 e M3 isoladas também foram cultivadas em meio MS modificado para *B. subtilis*, visto que elas apresentaram melhor crescimento neste meio em teste realizado anteriormente. A temperatura de cultivo foi de $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a agitação de 120 rpm. Para a construção das curvas de correlação D.O. x Biomassa destas cepa foram seguidos os procedimentos descritos no item 2.5.

2.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DE *B. subtilis*

Inicialmente a cepa foi cultivada no meio de cultivo in vitro para a *Vanilla planifolia* - MS básico, visto que foi neste meio para germinação da *Vanilla* em que a cepa foi isolada. Algumas variações deste meio foram testadas com o objetivo de estabelecer um meio mais simples e mais barato para cultivo e também porque a cepa não apresentou bom crescimento em meios como caldo nutriente e meio mineral. Para definir as modificações que seriam feitas com relação à presença ou ausência das substâncias que compõem o meio, utilizou-se um planejamento experimental Plackett-Burman no programa Statistica 5 (StatSoft Inc., 1995). O nível inferior (-1) representou

ausência da substância original no meio, o nível (0) representou 50% da concentração original do meio e o nível (1) representou 100% da concentração original do meio.

Também foram realizados alguns ensaios simples para a substituição dos compostos originais do meio (soluções A e B as quais são fontes de nitrogênio e as soluções C, D, E, e F fontes de micronutrientes do meio MS básico) por outros que pudessem servir como fonte de nitrogênio, assim como para fonte de carbono, mantendo as soluções originais do meio MS que apresentaram interferência positiva no crescimento microbiano.

Todas as análises de biomassa foram realizadas por densidade óptica em leitor espectrofotométrico Biotek Power Wave XS, com comprimento de onda de 600 nm, sendo que as leituras foram realizadas em triplicata e em cada poço da placa foi colocado 200 μ L do caldo fermentado com a biomassa. Os dados obtidos foram analisados em Graphpad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc. 1999).

Os cultivos foram iniciados com uma com 10% de inóculo em erlenmeyers de 125 mL a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e 120 rpm. O volume total de meio foi de 50 mL em cada frasco. Para proceder as medidas da produção de biomassa, foram retiradas alíquotas de 2 mL nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Após o estabelecimento do meio mais simples e eficiente para o cultivo da cepa isolada, realizou-se sua identificação por meio de análise molecular. A extração do DNA da cepa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia conforme descrito no item 2.3.

2.5 CURVA DE CRESCIMENTO E PREPARO DE INOCULO

Uma curva de crescimento dos microrganismos foi construída a partir de medidas da massa seca da biomassa a cada 8 horas. A determinação do peso seco foi realizada centrifugando-se 50 mL de fermentado a 10.000 rpm durante 15 min a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubos falcon de 50 mL. Após a centrifugação, os tubos com biomassa sedimentada foram secos em estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante. A diferença entre o

peso inicial de cada tubo e após secagem da biomassa foi utilizada para a construção da curva de crescimento microbiano. Os cultivos foram realizados em triplicata.

Uma alíquota de 200 µL foi tirada do fermentado de cada erlenmeyer a cada tempo de coleta para a leitura em placa de Elisa a um comprimento de onda de 600 nm, para a construção de uma curva de correlação entre o peso seco e a densidade óptica da biomassa.

A produção de inóculo foi feita de acordo com o tempo de concentração máxima de células viáveis que foi de 10^9 células/mL em 24 horas de fermentação estabelecida a partir da contagem de colônias em placas, obtidas pelo método das diluições e plaqueamento por espalhamento.

2.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À VANILINA E PRECURSORES EM MEIO LÍQUIDO

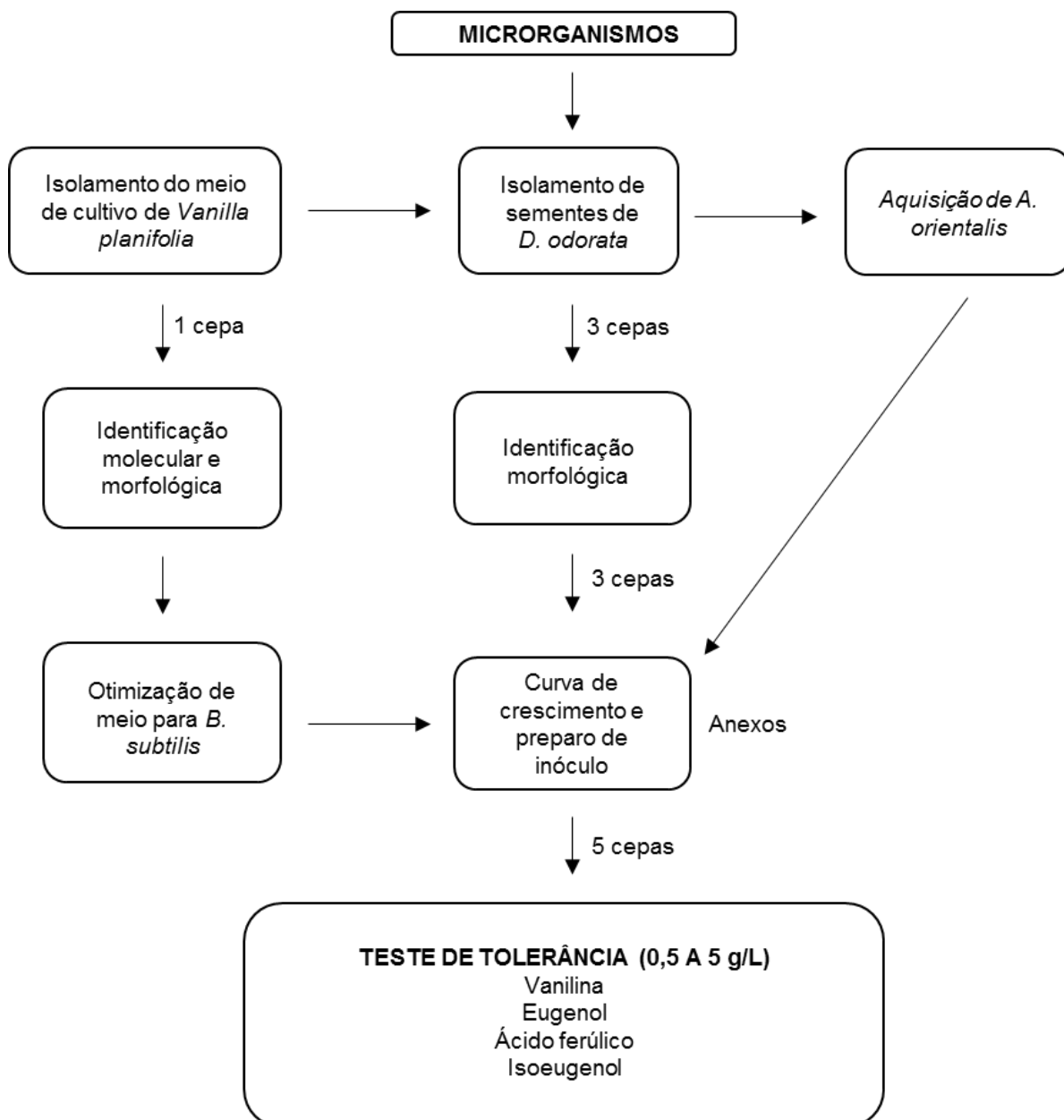
Testes de suscetibilidade dos microrganismos aos compostos precursores e à vanilina também foram feitos em meio líquido. Os microrganismos foram cultivados em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio apropriado a cada espécie (conforme descrito em 2.6.1 a 2.6.3) acrescido de Vanilina, eugenol, ácido ferúlico e isoeugenol foram utilizados em diferentes concentrações 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 g/L. Um controle com o mesmo volume de etanol P.A. e outro com H₂O também foi utilizado. O cultivo foi feito com um volume inicial de 3% de inóculo, durante 36 horas para as cepas isoladas e 48 horas para *A. orientalis*.

As leituras foram realizadas no tempo zero como branco e depois, no tempo de fermentação determinado para cada cepa. Foram consideradas tolerantes as cepas que apresentaram algum crescimento na presença dos compostos.

2.6.1 Preparo das soluções

Para os experimentos de bioconversão foram usados os precursores ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol da Merk® com 99,8% de pureza. Com estes precursores foram preparadas soluções estoque, diluindo cada um deles em etanol P.A. com 99% de pureza a uma concentração de 50 g/L.

Para os cultivos dos microrganismos, as soluções foram colocadas no meio nas proporções de acordo com cada uma das concentrações estudadas nos planejamentos experimentais.



Fluxograma 1 – Metodologia desenvolvida desde o isolamento dos microrganismos estudados para a produção de vanilina, até os testes de tolerância dos mesmos.

2.7 PRODUÇÃO DE VANILINA

As etapas do estudo da produção de vanilina estão representadas no fluxograma 4.2.

2.7.1 Estudo 1: DCCR para *B. subtilis* e *A. orientalis*

Para o estudo do processo de produção de vanilina foi realizado um DCCR com quatro variáveis dependentes, dois níveis (Tabela 4.3) utilizando o programa Statistica 5.0 (StatSoft Inc., 1995). Foram realizados estudos com *Bacillus subtilis* e com *Amycolatopsis orientalis* para determinar as melhores condições de cultivo e maximizar a produção de vanilina a partir de eugenol e ácido ferúlico.

Tabela 4.3 – Variáveis e níveis com respectivos valores do planejamento experimental DCCR para otimização do processo de produção de vanilina por *B. subtilis* e *A. orientalis*.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	VALORES				
	-2	-1	0	1	2
Tempo de adição de precursor (h)	0	12	24	36	48
Concentração de fonte de Carbono (g/L)	0	5	10	15	20
Inóculo (%)	1	3	5	7	9
Concentração do precursor (g/L)	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9

A concentração máxima dos precursores para o planejamento foi estabelecida de acordo com as utilizadas por Ashengroph *et al.* (2012) e Ashengroph *et al.* (2011). As variáveis dependentes foram: concentração de biomassa (g/L) e produção de vanilina (g/L). As melhores condições de produção de vanilina foram analisadas também por HPLC (conforme descrito no item 2.8).

Neste planejamento alíquotas de 2 mL foram tiradas a cada 24 horas para cada um dos ensaios (0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h).

2.7.2 Estudo 2: repetições das melhores condições do estudo 1

A fim de verificar um possível aumento na taxa de bioconversão dos substratos em vanilina foram feitos experimentos, com todas as cepas, na condição do estudo 1 que apresentou maior produção com *A. orientalis*. Nestes experimentos, foi utilizada uma concentração dos precursores ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol a 10 g/L conforme os trabalhos de Shimoni *et al.* (2000) e Zhang *et al.* (2006). Estes autores após 24 horas de fermentação, utilizaram 10 g/L de precursores para selecionar, isolar e testar a capacidade de *B. subtilis* em bioconverter tais moléculas em vanilina.

2.7.3 Estudo 3: DCCR para *B. subtilis*, *A. orientalis*, M1, M2 e M3

A análise da produção de vanilina foi realizada em outro planejamento experimental DCCR, sendo que desta vez foram definidas apenas duas variáveis considerando os resultados do primeiro planejamento. As variáveis independentes testadas foram concentração de açúcar e concentração de precursor. O tempo de adição dos precursores e a porcentagem de inóculo foram fixados em 12 horas e 7%, respectivamente. Neste caso foi testado mais um precursor o isoeugenol e o DCCR foi composto por 11 ensaios, 2 fatores e 2 níveis. Sendo que para as concentrações de açúcar os níveis foram -1,41; -1; 0; +1 e +1,41 representando 0 g/L; 2,91 g/L; 10 g/L; 17,09 g/L e 20 g/L, respectivamente. Para as concentrações de precursores os níveis testados foram os mesmos porém os valores correspondentes a cada nível foram: 0 g/L, 0,15 g/L, 0,5 g/L, 0,85 g/L e 1 g/L, respectivamente.

Fluxograma 2 – Metodologia desenvolvida desde o isolamento dos microrganismos estudados para a produção de vanilina, até os testes de tolerância dos mesmos.

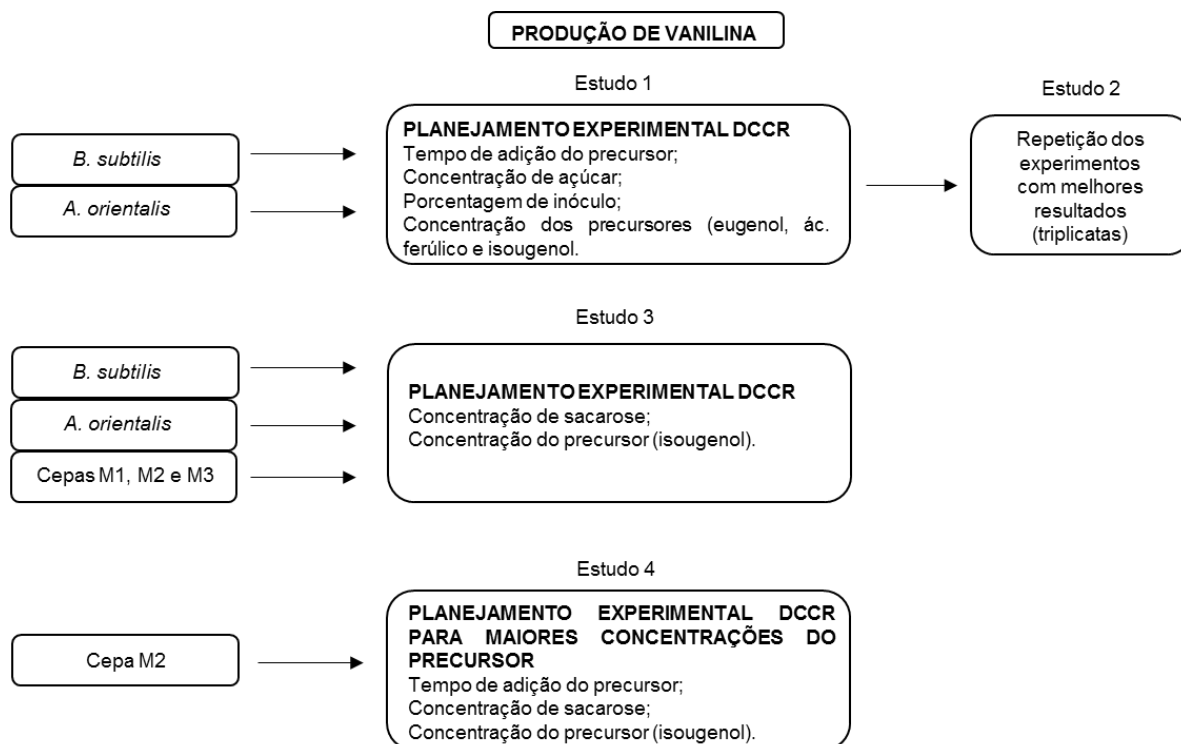
2.7.4 Estudo 4: DCCR para a cepa M2 com maiores concentrações do precursor

Para otimização das condições de produção de vanilina pela cepa isolada M2 a partir do isoeugenol e para investigar um possível efeito de concentrações entre 1 e 10 g/L de substrato, foi realizado um DCCR com duas variáveis independentes, a concentração de açúcar e a concentração de substrato. Contudo neste planejamento os níveis testados foram modificados conforme consta na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Variáveis e níveis com respectivos valores do planejamento experimental DCCR para otimização do processo de produção de vanilina pela cepa M2.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	VALORES				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Tempo de adição de precursor (h)	0	12	24	36	48
Concentração de fonte de Carbono (g/L)	1	3,76	10,5	17,24	20
Concentração do precursor (g/L)	1	2,3	5,5	8,7	10

Neste estudo o tempo total de fermentação foi de 120 horas e as alíquotas foram retiradas com 0, 12, 72, 96 e 120 horas e congeladas até serem analisadas.



Fluxograma 2 – Metodologia desenvolvida para estudo das condições de produção de vanilina pelas cepas microbianas *A. orientalis*, *B. subtilis*, M1, M2 e M3.

2.8 ANÁLISE DA VANILINA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido ao grande número de amostras, foi utilizado o método colorimétrico conforme descrito no capítulo anterior para realização de um seleção de amostras a fim de detectar a presença de vanilina. As amostras que apresentaram um indicativo da presença desta molécula pelo desenvolvimento de cor amarela, foram então analisadas por HPLC.

A análise por HPLC foi realizada em equipamento Varian Pro Star 350 com detector UV e coluna Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu de água ultra pura acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) e acetonitrila a 10 % (fase A) e água acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila a 35 % (fase B) conforme Overhage *et al.*, (1999). O fluxo na coluna foi estabelecido a 0,7 mL/min, o comprimento de onda foi de 270 nm e o tempo de corrida de 30 minutos.

Para a análise quantitativa, os compostos padrões foram diluídos em água ultra pura. Neste caso a vanilina utilizada foi grau UV/HPLC (Merk®). As concentrações dos padrões foram de 0,01 g/L, 0,02 g/L, 0,05 g/L, 0,07 g/L e 0,1 g/L. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e a análise estatística foi realizada usando o programa Statistica 5.0 (StatSoft Inc., 1995).

3 ANÁLISES DOS RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DA CEPA

O microrganismo isolado do meio de cultivo da *Vanilla* foi identificado como *Bacillus subtilis*. A identificação foi feita pela sequência Inter gênica 16s RDNA (abaixo) com 787 nucleotídeos apresentando similaridade de 100% e a sequência foi depositada no GenBank sob o número KM083604 com a denominação MLPB.

1GGG.....	ACA ₄₈
49ATG.....	ACG ₉₆
97TGG.....	GCT ₁₄₄
145AAT.....	TGG ₁₉₁
192CTT.....	TGG ₂₃₈
239TGA.....	GAG ₂₈₆
287GGT.....	CGG ₃₃₂
333GAG.....	GGA ₃₇₈
379GCA.....	GTT ₄₂₄
425GTT.....	CGG ₄₇₀
471TAC.....	GGT ₅₁₆
517AAT.....	GGG ₅₆₂
563CTC.....	AAC ₆₀₈
609CGG.....	GGA ₆₅₄
655GAG.....	AGG ₇₀₀
701AAC.....	AGG ₇₄₆
747AGC.....	GGT ₇₈₇

3.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Os resultados dos testes para determinar a composição mais adequada do meio para cultivo da cepa isolada estão representados no gráfico 4.1, sendo que a

solução A (Nitrato de Amônio) do meio MS original apresenta influência negativa significativa sobre o crescimento bacteriano e apenas as soluções E ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e C (H_3BO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KI e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) apresentaram efeito significativo positivo para desenvolvimento da cepa. Ou seja, a presença da solução A, contendo nitrato de amônia inibe a formação de biomassa de *B. subtilis* MLPB.

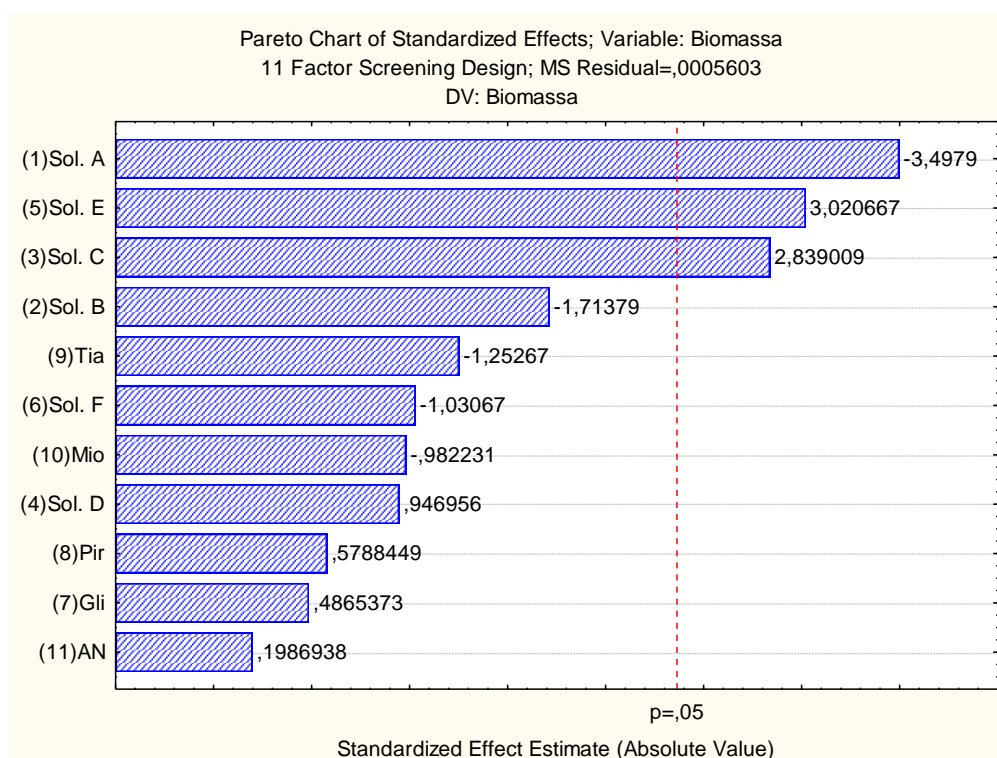


Gráfico 4.1 – Diagrama de efeitos de Pareto conforme planejamento experimental Plackett-Burman de otimização do meio de crescimento MS para *B. subtilis* MLPB.

No estudo para escolha da fonte de nitrogênio, os melhores resultados encontrados foram com a utilização de peptona no meio de cultivo. A biomassa produzida foi de $1,494 \pm 0,014$ g/L (Gráfico 4.2). Para fonte de carbono, a melhor produção de biomassa foi obtida utilizando a sacarose. Desta forma o meio estabelecido para cultivo desta cepa microbiana foi o meio MS modificado como mostrado na tabela 4.4.

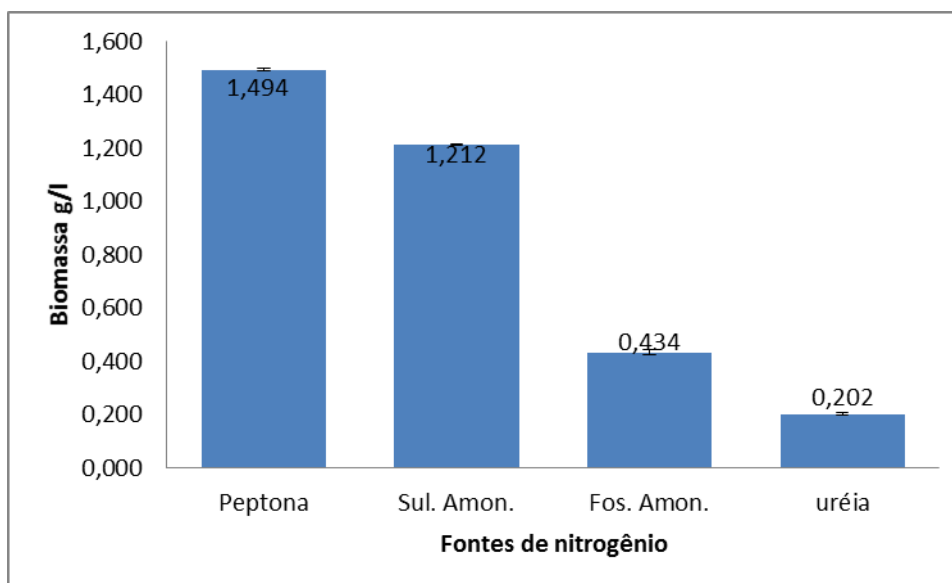


Gráfico 4.2 – Biomassa de *B. subtilis* MLPB produzida na presença de distintas fontes de nitrogênio: peptona (5 g/L), sulfato de amônio (Sul. Amon.) (5 g/L), fosfato de Amônio (Fos. Amon.) (5 g/L) e ureia (5 g/L) a 29 °C ± 1, durante 48 horas.

Voss (2013) mediu a biomassa de *B. subtilis* produzida em meio otimizado, obtendo concentração celular máxima em cultivo submerso de 2 g/L em 11h de fermentação em biorreator. Estes valores estão próximos dos que foram alcançados no presente trabalho. Contudo em alguns casos, há relatos como os de Nikel *et al.* (2005) que chegaram a alcançar cerca de 9 g/L de biomassa de *E. coli* após experimentos de otimização de cultivo celular.

Tabela 4.4 – Composição e concentração dos componentes do meio MS modificado para cultivo de *B. subtilis*.

Compostos	Concentração
Solução C	5 mL/L
Solução E	5 mL/L
Peptona	5 g/L
Sacarose	20 g/L

3.3 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DAS CEPAS DE *D. odorata*

Através da metodologia de isolamento utilizada foram isoladas três cepas, M1 (Figura 4.2), M2 (Figura 4.3) e M3 (Figura 4.4) com possível tolerância à vanilina, eugenol e isoeugenol. As três apresentam a morfologia de Bacilos e são gram-positivas.



Figura 4.2 – Cepa bacteriana (M1) isolada de sementes de *D. odorata* em meio Caldo nutriente contendo vanilina e eugenol a 5 g/L.



Figura 4.3 – Cepa bacteriana (M2) isolada de sementes de *D. odorata* em meio Caldo nutriente contendo vanilina e eugenol a 5 g/L.



Figura 4.4 – Cepa bacteriana (M3) isolada de sementes de *D. odorata* em meio Caldo nutriente contendo vanilina e eugenol a 5 g/L.

3.4 TESTES DE TOLERÂNCIA EM MEIO LÍQUIDO

3.4.1 *Amycolatopsis orientalis*

A cepa *A. orientalis* apresentou crescimento em todas as concentrações dos precursores testados, contudo na presença da vanilina a 5 g/L, não houve crescimento. Neste caso, pode-se notar claramente uma inibição do crescimento microbiano pelas concentrações maiores deste composto. Por outro lado, o isoeugenol foi o que inibiu menos o crescimento do microrganismo e parece que de alguma forma ele favoreceu a formação da biomassa em maiores concentrações chegando a uma biomassa $0,594 \text{ g/L} \pm 0,017$ em 48 h (Gráfico 4.3).

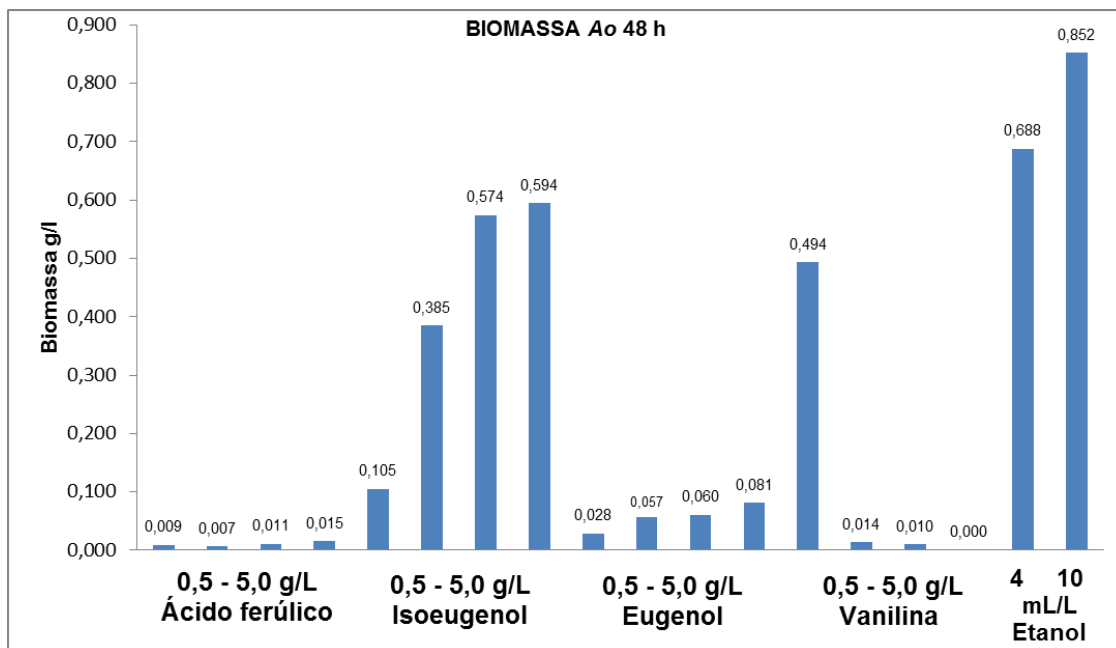


Gráfico 4.3 – Formação de biomassa de *A. orientalis* em meio YM na presença de vanilina e precursores e os controles com os volumes correspondentes de etanol para as duas maiores concentrações.

3.4.2 *Bacillus subtilis*

Para o *B. subtilis* MLPB só foi possível observar algum crescimento na presença dos precursores isoeugenol nas concentrações de 2,0 e 5,0 g/L e eugenol a 5,0 g/L apresentando, nestes casos um padrão parecido com a cepa anterior. Na presença de vanilina a cepa só produziu biomassa na concentração de 0,5 g/L do composto no meio. Estes resultados mostram que esta cepa é sensível a presença de vanilina e de ácido ferúlico, já que não apresentou formação de biomassa nos testes (Gráfico 4.4).

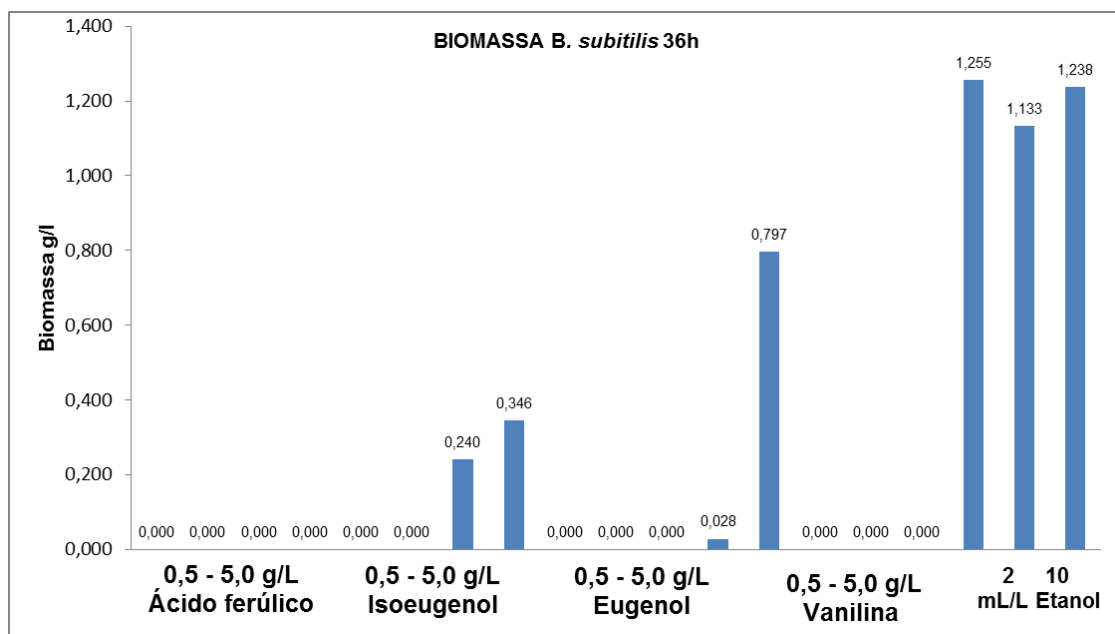


Gráfico 4.4 – Formação de biomassa de *B. subtilis* MLPB em meio MS modificado acrescido de 5 g/l de sacarose na presença de vanilina e precursores e os controles com os volumes correspondentes de etanol para as duas maiores concentrações.

3.4.3 M1, M2 e M3

As cepas isoladas M1, M2 e M3 apresentaram crescimento em todas as condições testadas conforme apresentado no gráfico 4.5.

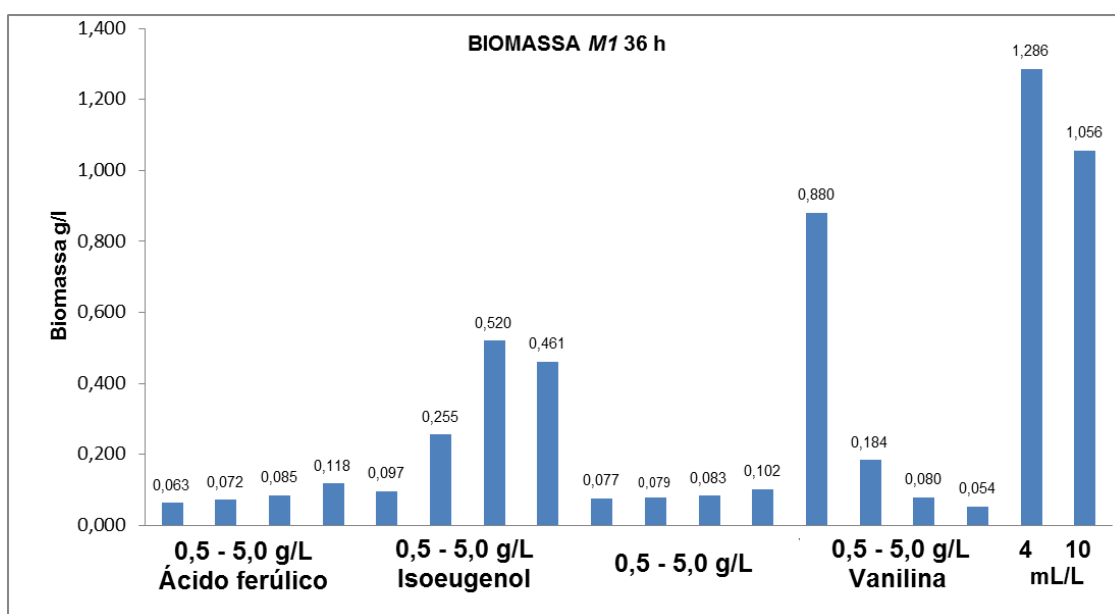


Gráfico 4.5 – Formação de biomassa da cepa M1 em meio MS modificado acrescido de 5 g/l de sacarose na presença de vanilina e precursores e os controles com os volumes correspondentes de etanol para as duas maiores concentrações.

A cepa isolada M2 produziu um máximo de massa celular $0,339 \text{ g/L} \pm 0,026$ na presença do isoeugenol a $5,0 \text{ g/L}$ e $0,380 \text{ g/L} \pm 0,021$ com eugenol no meio a $5,0 \text{ g/L}$ conforme mostrado no gráfico 4.6.

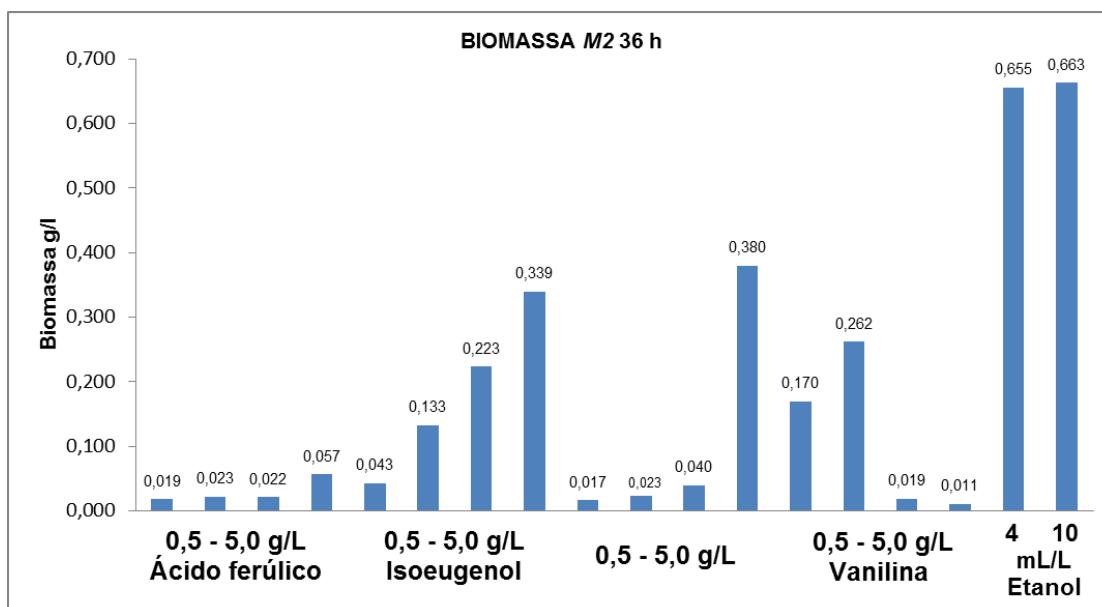


Gráfico 4.6 – Formação de biomassa da cepa M2 em meio MS modificado acrescido de 5 g/l de sacarose na presença de vanilina e precursores e os controles com os volumes correspondentes de etanol para as duas maiores concentrações.

A cepa M3 atingiu com concentração celular máxima de $0,492 \text{ g/L} \pm 0,041$ e $0,524 \text{ g/L} \pm 0,003$ com vanilina a $0,5 \text{ g/L}$ (Gráfico 4.7).

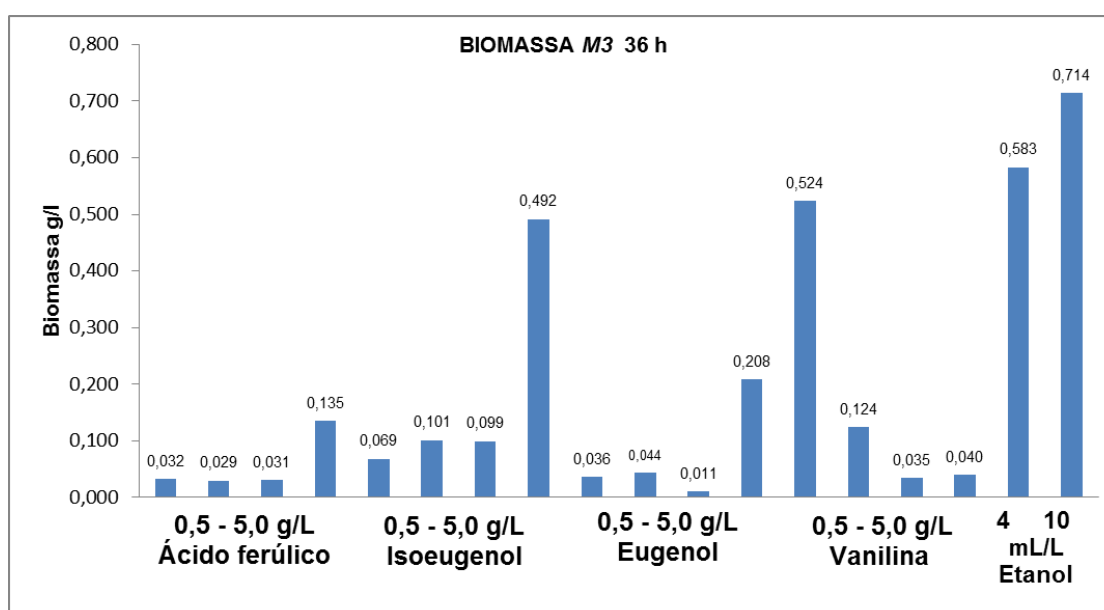


Gráfico 4.7 – Formação de biomassa da cepa M3 em meio MS modificado acrescido de 5 g/l de sacarose na presença de vanilina e precursores e os controles com os volumes correspondentes de etanol para as duas maiores concentrações.

Os resultados obtidos com *B. subtilis* MLPB (Gráfico 4.4) em relação à ação antimicrobiana do eugenol estão de acordo com os resultados de Sherer *et al.* (2009) que analisaram entre outras coisas, a atividade antimicrobiana do óleo essencial do cravo da Índia composto de mais de 80% de eugenol para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*. Em seus estudos os autores concluíram que este óleo apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana de moderada a forte com concentração mínima inibitória de 0,4 mg/mL – 0,6 mg/mL em média para a maioria dos microrganismos testados. Lima *et al.*⁴ (2006 citado por Raggi 2008) também aponta o eugenol como um dos compostos responsáveis pela ação antimicrobiana apresentada por alguns extratos de plantas.

As cepas *A. orientalis* (Gráfico 4.3) e M1, M2 e M3 (Gráficos 4.5 a 4.7) apresentaram maior tolerância a este composto sendo que as três últimas apresentaram melhor crescimento na concentração mais alta testada.

A adição de até 3 g/L de ácido ferúlico apresentou pouco efeito sobre o crescimento celular e sobre o metabolismo de *Amycolatopsis sp.*, porque neste nível o ácido é rapidamente diminuído no caldo devido a sua metabolização. O impacto foi medido pelas concentrações do ácido ferúlico e produtos do seu metabolismo tais como guaiacol e ácido vanílico (Kaur & Chakraborty 2013). Neste estudo, apenas o *B. subtilis* MLPB não apresentou qualquer crescimento na presença de ácido ferúlico (gráfico 4.4). As isoladas M1, M2 e M3 foram as que apresentaram maior capacidade de crescimento na presença de ácido ferúlico até 5,0 g/L. Nas condições testadas, *A. orientalis* (gráfico 4.3) não apresentou resultados condizentes com os relatados por Kaur & Chakraborty (2013) visto que a presença de ácido ferúlico apresentou inibição considerável em seu desenvolvimento.

No caso da vanilina era de se esperar a inibição no crescimento dos microrganismos principalmente nas concentrações a partir de 2,0 g/L, visto que esta já é uma concentração capaz de inibir o desenvolvimento microbiano em algumas espécies. Ma e Daugulis (2013) relatam a inibição do crescimento de *Amycolatopsis*

⁴ LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; MORENO, P. R. H. **Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State – Brazil.** Pharmacologyonline. Vol. 3, P. 589-593, 2006.

sp. ATCC 39116 em concentrações de vanilina entre 2 e 10 g/L, sendo esta adicionada 12 horas após a inoculação, isto é, na fase exponencial.

Os resultados do presente trabalho para *A. orientalis* estão de acordo com os de Ma e Daugulis (2013) visto que esta cepa apresentou capacidade de crescimento na presença de vanilina até a concentração de 2,0 g/L (gráfico 4.3). O mesmo não pode ser verificado para o *B. subtilis* (gráfico 4.4). Este microrganismo não se comportou como relatado pelos autores em questão, ou seja, ele não foi capaz de crescer na presença de vanilina a partir de 1,0 g/L. Mas as cepas M1, M2 e M3 parecem tolerar a vanilina (gráficos 4.5 a 4.7), sendo que todas as 3 cepas conseguiram formar pequenas quantidades de biomassa a concentrações de 5,0 g/L de vanilina nas condições estudadas.

A capacidade que os microrganismos apresentam em crescer na presença de substâncias como ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol pode ser explicada pela indução, por estes compostos, da produção de enzimas capazes de degradar tais substâncias. Fleige *et al.* (2012) investigaram esta relação em *Amycolatopsis sp.* ATCC 39116 e puderam demonstrar a atividade de uma desidrogenase da vanilina. Além disso, eles concluíram que a expressão do gene correspondente nesta cepa parece induzida pelo substrato da enzima, e outros estruturalmente relacionados tais como o ácido ferúlico. Pois não encontraram atividade desta enzima em cultivo de células na ausência desta substância. Gasson *et al.* (1998) mostraram que as reações de hidratação e de clivagem do tio éster CoASH de ácido ferúlico são catalisadas por uma enzima codificada por um único gene de 828 pb. Os produtos da reação são vanilina e acetil-SCoA. A catálise de ambas as reações por uma única enzima foi mostrada por expressão heteróloga do gene em *E. coli*. As conclusões foram suportadas pela presença de três produtos da reação, feruloil-SCoA, vanilina, e acetil-SCoA.

Overhage *et al.* (1999) utilizaram um mutante de *Pseudomonas sp.* HRRvdhWKm cultivado em meio com eugenol como única fonte de carbono e mostraram uma via de degradação por meio de uma β -oxidação da cadeia lateral de ácido ferúlico. Sem vanilina como intermediário também pode ser possível, mas observaram que a vanilina representa um intermediário obrigatório do catabolismo de eugenol em *Pseudomonas sp.* HR199 (linhagem selvagem). Isto também é verdade

tanto para a vanilina quanto para aldeído coniferílico, que são intermediários do catabolismo de eugenol.

3.5 PRODUÇÃO DE VANILINA

3.5.1 Bioconversão por *Amycolatopsis orientalis*

Conforme apresentado no gráfico 4.7, para os ensaios de bioconversão do ácido ferúlico, o melhor resultado foi obtido nas condições do ensaio 17 com absorbância de 0,385. Neste ensaio a concentração do precursor foi de 0,5 g/l e o tempo de adição do precursor foi de 24 horas a partir do início do cultivo. A taxa de inóculo foi de 5% e o meio YM foi feito sem adição de açúcar. Nos experimentos utilizando eugenol como precursor (gráfico 4.8) a maior concentração de vanilina foi obtida no ensaio 12 nas condições de 0,3 g/l de precursor adicionado após 36 horas do início do cultivo, 7% de inóculo e meio contendo 15 g/L de glicose. Nos dois casos os resultados aqui apresentados são das amostras retiradas após 96 horas de fermentação.

Os resultados do primeiro planejamento experimental demonstraram que o tempo de adição do precursor, a taxa de inóculo e a concentração do precursor na fermentação não apresentam efeitos significativos nas condições estudadas em nosso trabalho. Por outro lado a concentração de glicose foi a única variável estudada que apresentou efeito significativo positivo para o ácido ferúlico (Gráfico 4.8). No caso do eugenol, além da concentração de glicose, a concentração do precursor também exerceu influência negativa e significativa para produção de vanilina quando considerada a função linear (Gráfico 4.9).

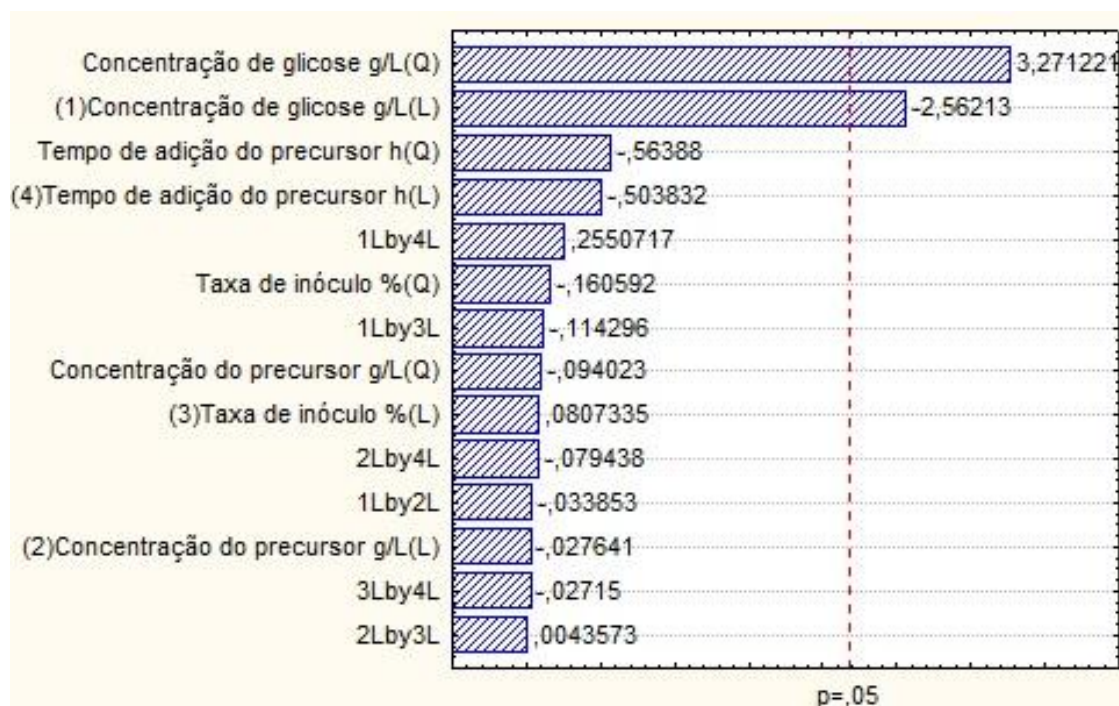


Gráfico 4.8 – Diagrama de efeitos de Pareto para bioconversão de ácido ferúlico em vanilina por *A. orientalis*.

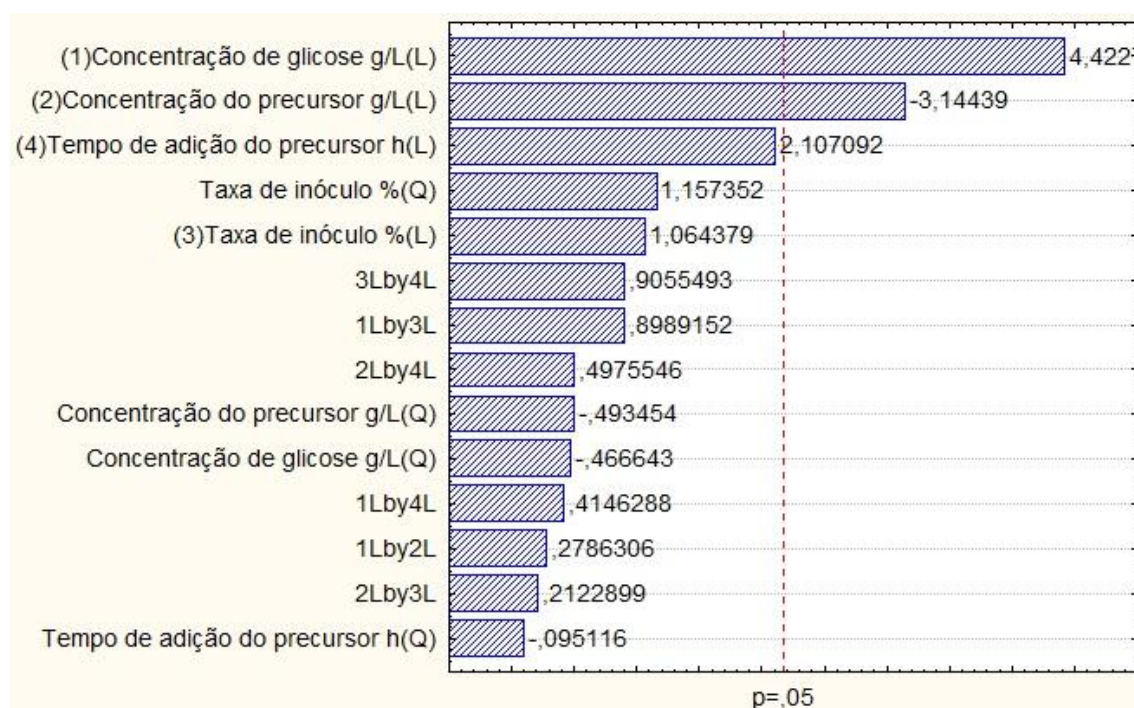


Gráfico 4.9 – Diagrama de Pareto para a produção de vanilina a partir de eugenol no processo com *A. orientalis* durante 96 horas de fermentação.

3.5.2 Repetições dos ensaios do DCCR

As repetições das melhores condições para a produção de vanilina na fermentação por *A. orientalis*, apresentaram uma produção média de vanilina a partir de ácido ferúlico de 10,448 mg/L \pm 0,344 no tempo de 96 h de fermentação. Neste caso como a concentração do precursor foi de 500 mg/L a produção de vanilina foi de aproximadamente 2,09%. Estes valores foram encontrados por análises em HPLC.

Utilizando o eugenol como precursor *A. orientalis* apresentou um produção média nas repetições dos melhores ensaios de 46,015 mg/L \pm 8,017 no tempo de 96 h de fermentação. Desta forma a produção relativa de vanilina foi de 15,34 %, visto que foram colocados 300 mg/L de precursor no meio de cultivo. Assim como no caso anterior estes valores foram obtidos por análises cromatográficas.

Estatisticamente, os resultados apresentaram efeito significativo da concentração de glicose na produção de vanilina a partir de ácido ferúlico (Gráfico 4.10).

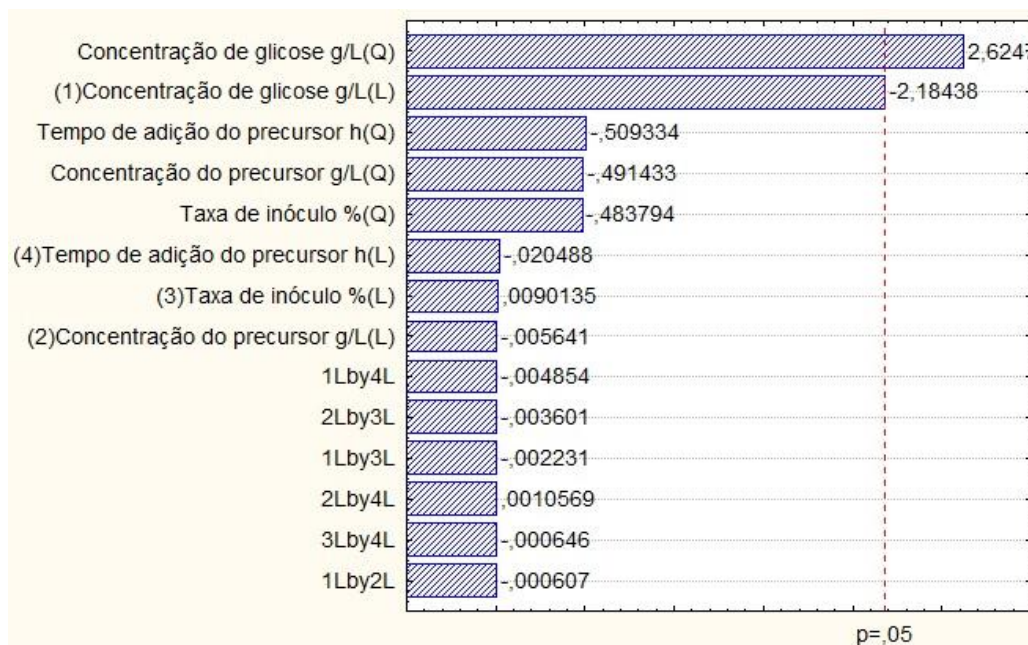


Gráfico 4.10 – Diagrama de efeitos de Pareto para o planejamento experimental do processo com *A. orientalis* durante 96 horas de fermentação para o ácido ferúlico.

Na fermentação com eugenol a concentração do precursor teve efeito significativo negativo na produção de vanilina conforme observado no diagrama de

gráfico 4.11 no caso da função linear, porém quando observada a função quadrática o efeito é não significativo.

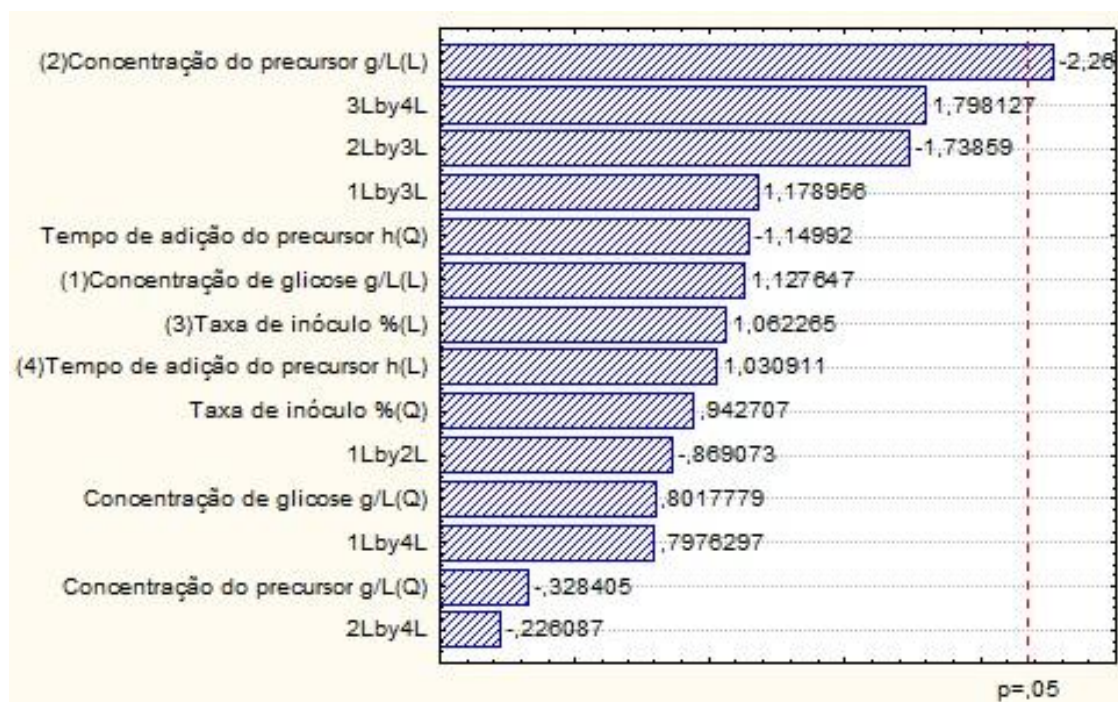


Gráfico 4.11 – Diagrama de efeitos de Pareto para o planejamento experimental do processo com *A. orientalis* durante 96 horas de fermentação para o eugenol.

3.5.3 Segundo planejamento para produção de vanilina

Diante dos resultados do primeiro DCCR pode-se estabelecer para o próximo planejamento, o tempo de adição do precursor em 12 horas após o início da fermentação e a taxa de inóculo em 7%. Variando desta forma apenas a concentração de açúcar (0 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L e 20 g/L) e a concentração do precursor (0,1 g/L, 0,03 g/L, 0,5 g/L 0,7 g/L e 0,9 g/L), já que foram as duas que apresentaram efeitos significativos.

3.5.3.1 Estudos das condições para a bioconversão de ácido ferúlico a vanilina por *A. orientalis*

A partir dos resultados deste planejamento podemos confirmar que de fato para o ácido ferúlico a concentração de glicose na função linear apresenta efeito significativo positivo, sobre a produção de vanilina por *A. orientalis* nas condições testadas, contudo no caso da função quadrática o efeito é significativamente negativo.

Com relação à concentração de ácido ferúlico pode-se reafirmar também que, nas condições estudadas, não houve qualquer efeito significativo deste sobre a produção de vanilina.

3.5.3.2 Estudos das condições para a bioconversão de eugenol a vanilina por *A. orientalis*

Diferentemente do ocorrido na fermentação com ácido ferúlico, na fermentação com eugenol foi possível observar um efeito significativamente positivo para a produção de vanilina na função quadrática e significativamente negativo na função linear do aumento da concentração de glicose conforme mostrado no gráfico 4.12. Desta forma estes resultados nos permite afirmar que a concentração de glicose é um fator de influência significativamente negativa na produção de vanilina a partir do eugenol como precursor e não apresenta o mesmo efeito no caso do ácido ferúlico.

Já a concentração do precursor no meio não apresentou efeito significativo nos níveis testados para a produção de vanilina. Porém diferentemente do ácido ferúlico não pode ser percebida uma tendência de que o aumento desta concentração poderia ser um fator inibidor da produção de vanilina a partir de eugenol por *A. orientalis* nas condições estudadas (Gráfico 4.12).

Os resultados observados indicam que a produção de vanilina sofreu influência significativa positiva do aumento da concentração de glicose para as fermentações com eugenol dentro de uma determinada faixa, mas parece que a partir de um determinado ponto os quadros podem se inverter e efeitos nos dois casos podem ocorrer de forma inversa (Gráfico 4.12 e 4.13).

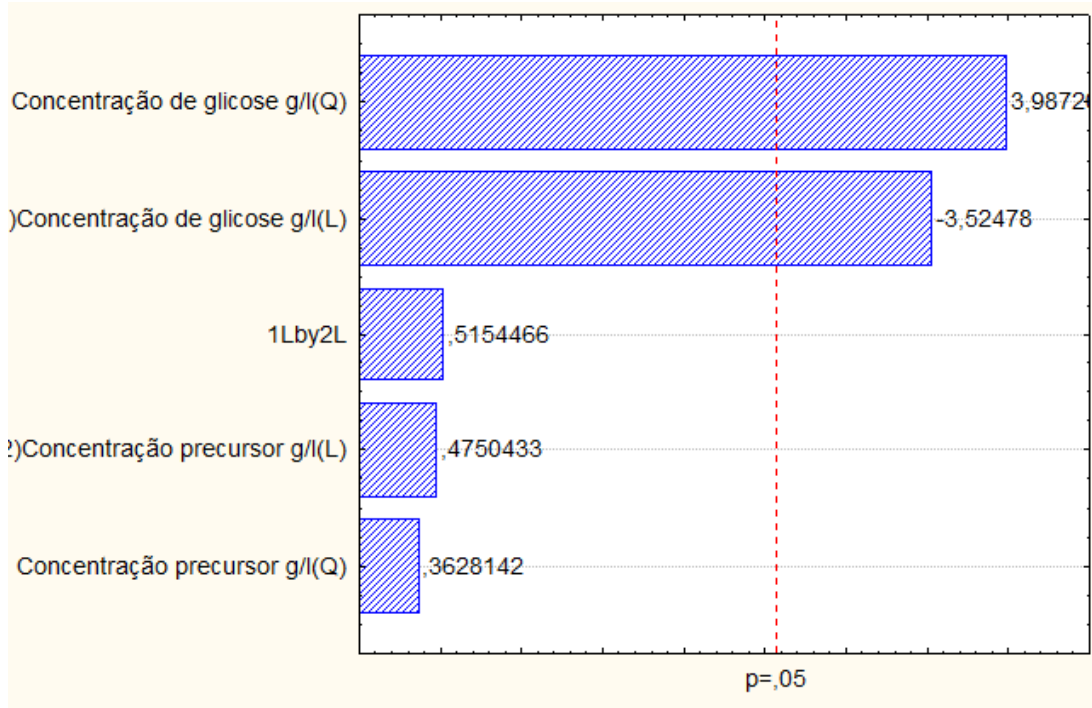


Gráfico 4.12 – Diagrama de Pareto para a produção de vanilina a partir de eugenol no processo com *A. orientalis* durante 96 horas de fermentação.

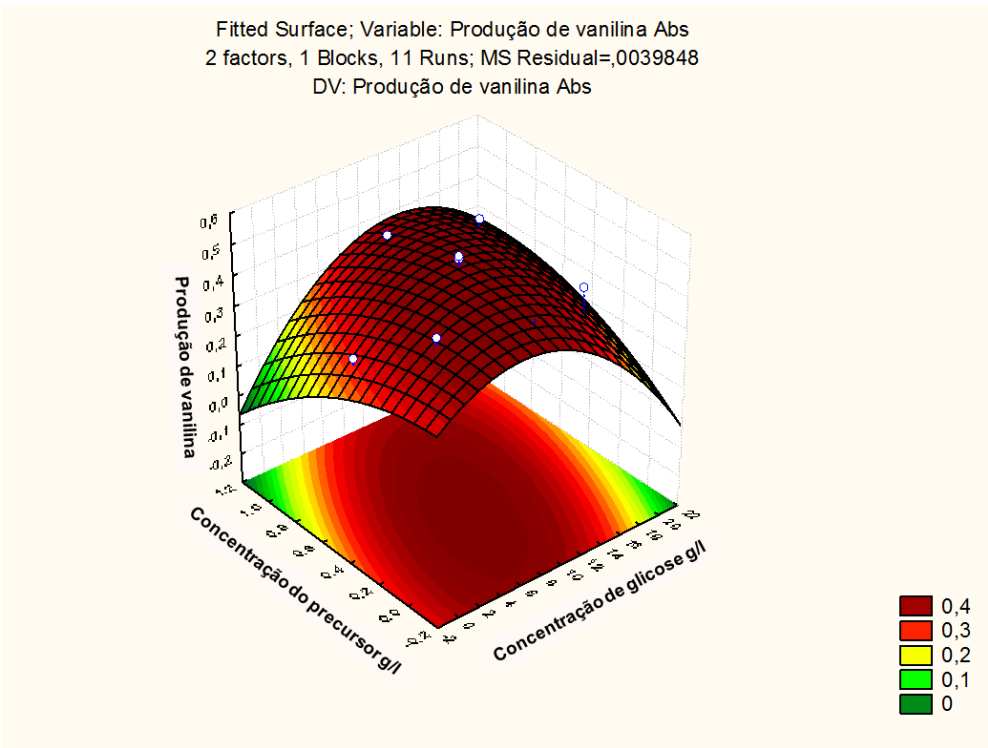


Gráfico 4.13 – Superfície de resposta mostrando uma possível tendência de efeito negativo do aumento da concentração do precursor sobre a produção de vanilina por *A. orientalis* a partir de eugenol.

3.5.3.3 Estudos das condições para a bioconversão de isoeugenol a vanilina por *A. orientalis*

Para os testes realizados com a utilização de isoeugenol como precursor podemos observar que as concentrações utilizadas de glicose no meio de cultivo influenciaram a produção de vanilina (Gráfico 4.14). Parece haver uma tendência de que o aumento de glicose possa favorecer a bioconversão de isoeugenol à vanilina. Quanto à concentração do precursor, ela se apresenta como não significativa dentro da faixa testada para a bioconversão do isoeugenol à vanilina neste trabalho.

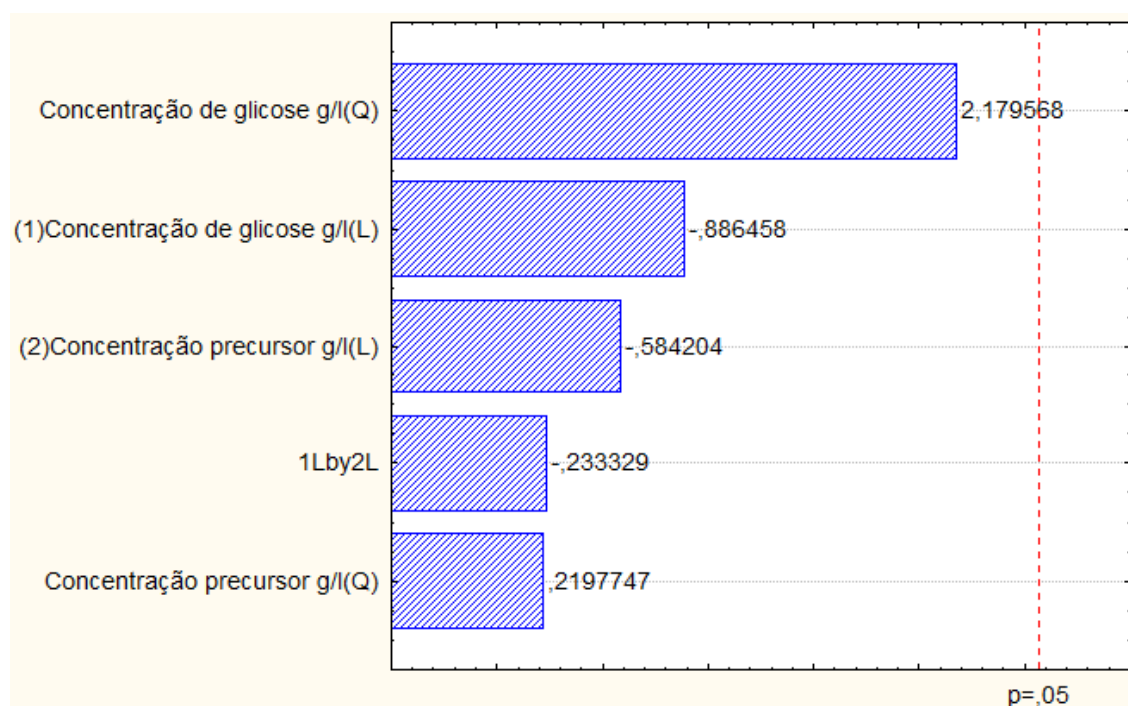


Gráfico 4.14 – Diagrama de efeitos de Pareto para o planejamento experimental do processo com *A. orientalis* durante 96 horas de fermentação para isoeugenol.

3.6 BIOCONVERSÃO DOS PRECURSORES

3.6.1 Bioconversão de ácido ferúlico por *A. orientalis*

A concentração máxima de vanilina obtida a partir do ácido ferúlico na fermentação por *A. orientalis* nas condições estabelecidas foi de 8,015 mg/L no ensaio 8 (0,7 g/L de precursor, tempo de adição do precursor 36 h, porcentagem de inóculo (v/v) 7 % e 5,0 g/L açúcar) representando uma bioconversão de 0,80% e a bioconversão máxiam

foi de 3,98% g/g no ensaio 1 (0,3 g/L de precursor, tempo de adição do precursor 12 h, percentagem de inóculo (v/v) 3 % e 5,0 g/L açúcar) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Produção de vanilina e taxa de bioconversão de ácido ferúlico por *A. orientalis* nas condições dos ensaios 1, 5 e 8 durante 96 horas de fermentação.

Ensaio	Concentração de vanilina (mg/L)	Bioconversão % (g/g)
1	5,982	3,988
8	8,015	0,802

3.6.2 Bioconversão de eugenol por *A. orientalis*

Para o eugenol *A. orientalis* apresentou como a maior concentração de vanilina foi 27,392 mg/L e foi obtida nas condições do ensaio 5 (0,7 g/L de precursor, tempo de adição do precursor 12 h, percentagem de inóculo (v/v) 3 % e 5,0 g/L açúcar) e a maior bioconverção foi de 5,66% g/g a qual ocorreu no ensaio 1 (0,3 g/L de precursor, tempo de adição do precursor 12 h, percentagem de inóculo (v/v) 3 % e 5,0 g/L açúcar) 1) conforme tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Produção de vanilina e taxa de conversão de eugenol por *A. orientalis* nas condições dos ensaios 1, 2 e 5 durante 96 horas de fermentação.

Ensaio	Concentração de vanilina (mg/L)	Bioconversão % (g/g)
1	8,489	5,660
5	27,373	5,475

3.6.3 Bioconversão de isoeugenol por *A. orientalis*

No caso do isoeugenol (Tabela 4.7) em várias condições pode-se detectar formação de vanilina, mas a que apresentou a melhor produção foram as do ensaio 5 (0,3 g/L de precursor, tempo de adição do precursor 12 h, percentagem de inóculo (v/v) 3 % e 5,0 g/L açúcar) com produção de 11,805 mg/L, e as condições de maior bioconverção foram as do ensaio 3 (0,3 g/L de precursor, tempo de adição do precursor 12 h, percentagem de inóculo (v/v) 7 % e 5,0 g/L açúcar) onde alcançou-se 6,52 % g/g.

Tabela 4.7 – Produção de vanilina e taxa de conversão de isoeugenol por *A. orientalis* nas condições dos ensaios 1, 3, 5, durante 96 horas de fermentação.

Ensaios	Concentração de vanilina (mg/L)	Bioconversão % (g/g)
3	9,790	6,527
5	11,805	2,361

Overhage *et al.* (1999) conseguiram uma produção de 318 mg/L de vanilina a partir de eugenol na fermentação com uma linhagem mutante de *pseudomonas* sp e 210 mg/L de vanilina a partir de ácido ferúlico com *Pseudomonas putida*. Outros autores como Ashengroph *et al.* (2011) trabalhando com uma linhagem de *Pseudomonas resinovorans* SPR1 conseguiram uma produção de 79 mg/L de vanilina a partir da biotransformação do eugenol o que foi relatado por eles como uma eficiência de 9% de bioconversão. Yoon, *et al.* (2005) também descrevem em seus trabalhos a produção de 1,1 g/L de vanilina após 48 horas de fermentação por *E. coli* transformada geneticamente a partir de ácido ferúlico.

As maiores produções de vanilina relatada são de Muhein *et al.* (2001) que desenvolveram um bioprocesso onde conseguiram atingir uma produção de 8 a 16 g/L de vanilina no caldo fermentado num período de 5 a 50 horas de fermentação por *Streptomyces setonii* ATCC 39116 utilizando ácido ferúlico como precursor.

Li *et al.* (2008) detectaram uma concentração de 9,96 mg/L de vanilina formada pela conversão de ácido ferúlico após 12 horas de fermentação por *Enterobacter* sp Px6-4 isolada da *Vanilla*. O valor máximo de concentração encontrado por eles foi de 17,2 mg/L de vanilina depois de 108 horas de fermentação e Rabenhorst *et al.* (2003) que descreveram o isolamento de uma linhagem de *Amycolatopsis* sp. HR167 (DSM9991 or DSM9992) que foi capaz de converter 19,92 g/L de ácido ferúlico a 11,5 g/L vanilina após 32 h em uma escala de 10 L, o que corresponde a uma taxa de bioconversão de 77,8%.

Com relação ao gênero *Amycolatopsis*, Overhage *et al.* (2006) analisaram a capacidade de biotransformação do eugenol pela linhagem *Amycolatopsis* sp HR167 e verificaram apenas traços de vanilina no meio fermentado em aproximadamente 85 horas de fermentação.

De maneira geral os valores encontrados no presente trabalho com a utilização de *A. orientalis* nas condições de fermentação testadas aqui para a produção de vanilina, estão abaixo de alguns dos descritos na literatura, porém acima de outros (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 – Comparação entre a produção de vanilina e eficiência da cepa *A. orientalis* estudadas com algumas relatadas pela literatura.

Referência	Cepa	Vanilina/Isoeugenol	Eficiência molar
	<i>A. orientalis</i>	0,47 g/L / 10 g/L	5,04%
Ashengroph <i>et al.</i> , (2012)	<i>Psychrobacter</i> sp. Strain CSW4	0,14 g/L / 1 g/L	16,4%
Ashengroph <i>et al.</i> (2011)	<i>Pseudomonas</i> <i>resinovorans</i> SPR1	0,24 g/L / 2,5 g/L (eugenol)	10%
Zhang <i>et al.</i> (2006)	<i>Bacillus subtilis</i> HS8	1,36 g/L / 10 g/L	14,66%
Rabenhorst <i>et al.</i> (2003)	<i>Amycolatopsis</i> sp. HR167	11.5 g/L / 19.92 g/L (ácido ferúlico)	77,8%

3.6.4 Produção de vanilina e bioconversão de isoeugenol na concentração de 10 g/L por *A. orientalis*

Nos ensaios de fermentação por *A. orientalis* utilizando o isoeugenol e eugenol como precursores pode-se observar uma produção máxima de 467,49 mg/L de vanilina e 31,74 mg/L respectivamente (gráfico 4.15).

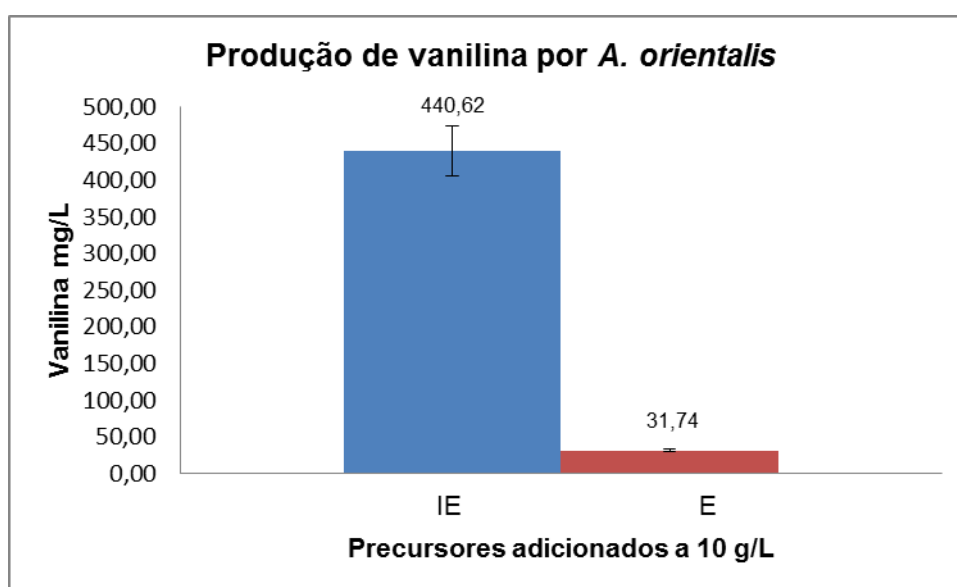


Gráfico 4.15 – Produção média de vanilina por *A. orientalis* com adição dos precursores isoeugenol (IE) e eugenol (E) na concentração de 10 g/L em 96 h.

A bioconversão para esta cepa foi neste caso de 4,41% (p/p) para o isoeugenol e de 0,32 % (p/p) para o eugenol, considerando os valores médios de produção.

Neste caso quando comparamos os valores de produção total de vanilina apresentados na literatura (Tabela 4.8) nossos valores estão dentro de uma faixa apresentada alcançadas em alguns trabalhos como Ashengroph *et al.* (2011); Overhage *et al.* (1999); Li *et al.* (2008) e Shimoni *et al.* (2000) e muito inferiores aos valores alcançados por Ashengroph *et al.*, (2012), Zhang *et al.* (2006); Rabenhorst *et al.* (2003) e Muhein *et al.* (2001).

3.7 BIOCONVERSÃO DOS PRECURSORES POR *B. subtilis*

3.7.1 Produção de vanilina a partir de ácido ferúlico por *Bacillus subtilis* MLPB

No planejamento experimental realizado para estudar a produção de vanilina por *B. subtilis* MLPB a concentração de açúcar e a concentração de precursor não tiveram efeitos significativos na produção de vanilina nas condições do planejamento (Gráfico 4.16).

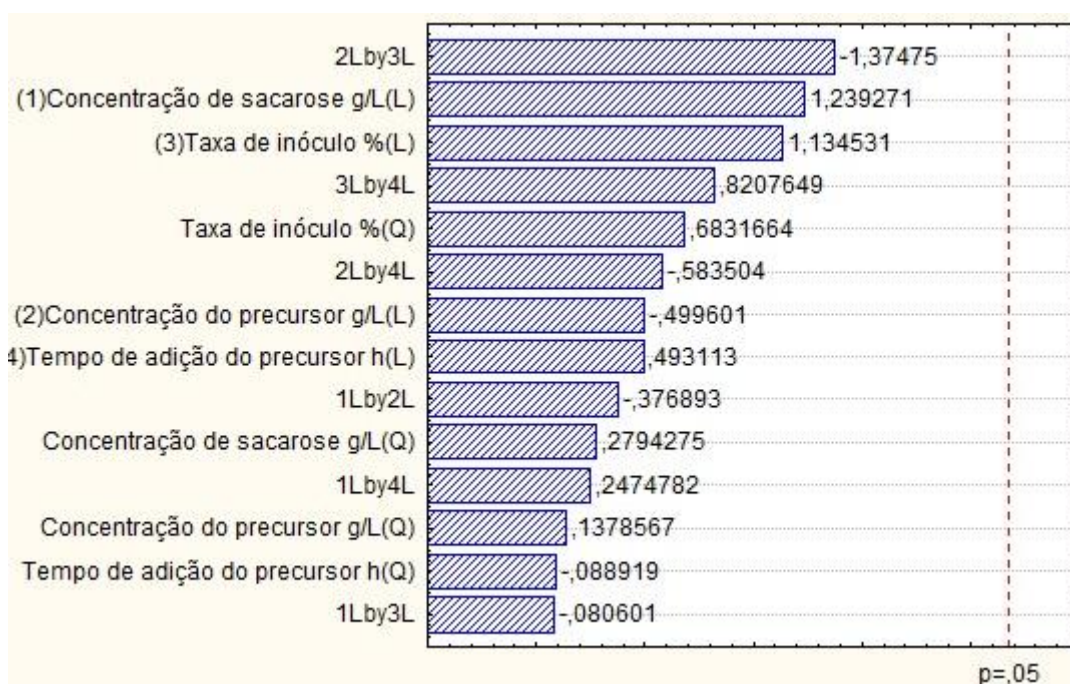


Gráfico 4.16 – Produção de vanilina por *B. subtilis* MLPB utilizando ácido ferúlico como precursor.

No DCCR feito para *B. subtilis*, utilizamos os mesmos níveis apresentados na tabela 4.3. Considerando, neste caso, a leitura por absorbância (método colorimétrico desenvolvido) a condição que indicou maior produção de vanilina foi a do ensaio 13 onde foi adicionado 0,7 g/L do precursor e 15 g/L de glicose e o tempo de cultivo foi de 72 h para o ácido ferúlico.

3.7.2 Produção de vanilina a partir de eugenol por *Bacillus subtilis* MLPB

Os valores de concentração de vanilina que indicam a melhor condição para produção de vanilina utilizando o eugenol como precursor, foram obtidos nas condições do ensaio 12 no tempo de 72 horas. Ou seja, com 0,3 g/L de precursor, tempo de adição do precursor de 36 horas, taxa de inóculo de 7% e sacarose a 15 g/L.

Devido aos baixos valores de produção de vanilina pela cepa nestas condições, não realizamos as repetições das condições indicadas como as melhores para produção de vanilina no primeiro planejamento.

3.7.3 Produção de vanilina e taxa de bioconversão dos precursores na concentração de 10 g/L por *Bacillus subtilis* MLPB

Na concentração de 10 g/L de precursor a linhagem *B. subtilis* MLPB foi capaz de produzir um máximo de 222,28 mg/L de vanilina a partir de isoeugenol, 69,53 mg/L a partir de eugenol e 6,07 mg/L utilizando o ácido ferúlico como precursor. Considerando os valores médios de produção (gráfico 4.19) observamos uma bioconversão de 2,22 %; 0,69 % e 0,06% para isoeugenol, eugenol e ácido ferúlico respectivamente.

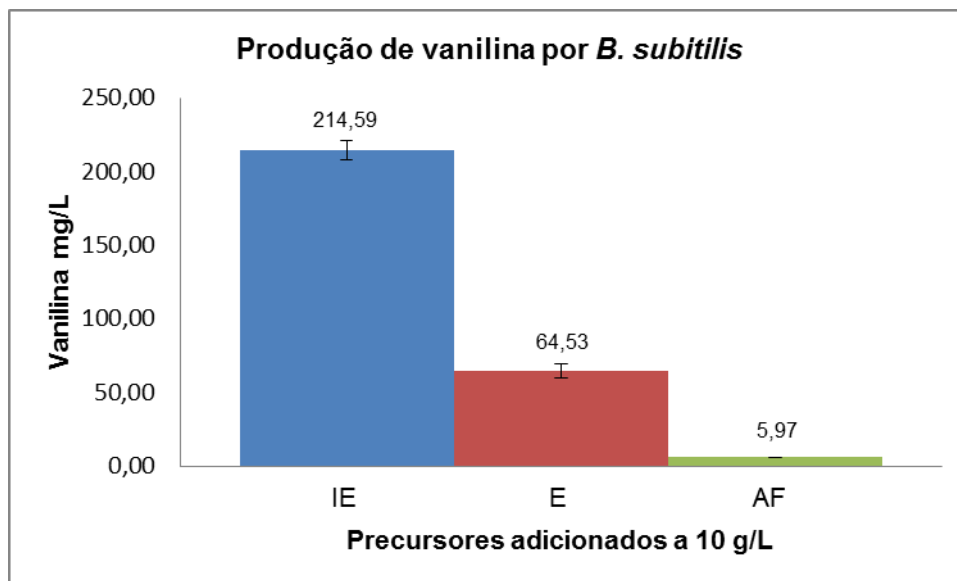


Gráfico 4.19 – Produção de vanilina por *B. subtilis* MLPB com adição de 10 g/L dos precursores isoeugenol (IE), eugenol (E) e ácido ferúlico (AF) na concentração de 10 g/L e tempo de fermentação de 96 h.

Os valores de produção de vanilina a partir de eugenol encontrados por Shimoni *et al.* (2000) foi de 0,6 g/L em 24 horas de fermentação. Os autores utilizaram uma cepa de *Bacillus* sp isolada de solo e que alcançou uma eficiência molar de 12 % de bioconversão. Resultado acima dos apresentados em nossos estudos. Também estudando o potencial do *Bacillus subtilis* HS8 em converter isoeugenol em vanilina Zhang *et al.* (2006) encontraram uma concentração de 1,36 g/L de vanilina após 96 horas de fermentação adicionando inicialmente 10 g/L de isoeugenol com *Bacillus subtilis* HS8. Valores que são maiores do que encontrou-se para o *B. subtilis* MLPB.

Kaur *et al.* (2014) durante seus estudos das vias metabólicas de degradação de ácido ferúlico por uma cepa de *Pediococcus acidilactici* BD16 conseguiram uma produção máxima de vanilina de 980 nM. Após o melhoramento genético da cepa juntamente com a otimização do processo por DCCR conseguiram produzir 3,14 mM de vanilina a partir de 1,08 mM de ácido ferúlico.

Estes dados reforçam a necessidade de mais estudos para estabelecimento das melhores concentrações dos precursores ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol nos processos de produção de vanilina com a cepa isolada *B. subtilis* MLPB.

3.8 BIOCONVERSÃO DOS PRECURSORES PELAS CEPAS ISOLADAS M1, M2 e M3

3.8.1 Produção de vanilina e taxa de bioconversão dos precursores na concentração de 10 g/l pelas cepas M1, M2 e M3

Os valores médios de produção de vanilina na condição testada para as cepas M1, M2 e M3 estão representados nos gráficos 4.20 a 4.22. A máxima produção de vanilina a partir dos precursores isoeugenol e eugenol foi para a cepa M1, 125,66 mg/L e 13,79 mg/L, respectivamente; para M2, 372,9 mg/L e 22,42 mg/L e para a M3, 262,61 mg/L e 16,82 mg/L.

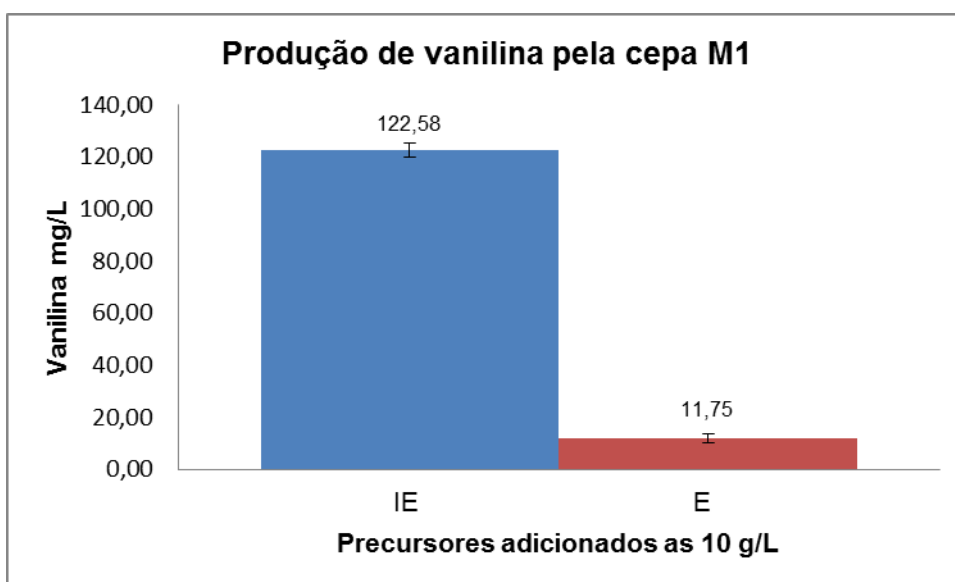


Gráfico 4.20 – Produção de vanilina pela cepa M1 com adição dos precursores isoeugenol (IE) e eugenol (E) na concentração de 10 g/L e tempo de fermentação de 96 h.

Considerando os resultados médios, a cepa M1 converteu a vanilina com um percentual de 1,22 % a partir de isoeugenol e 0,12 %, com eugenol.

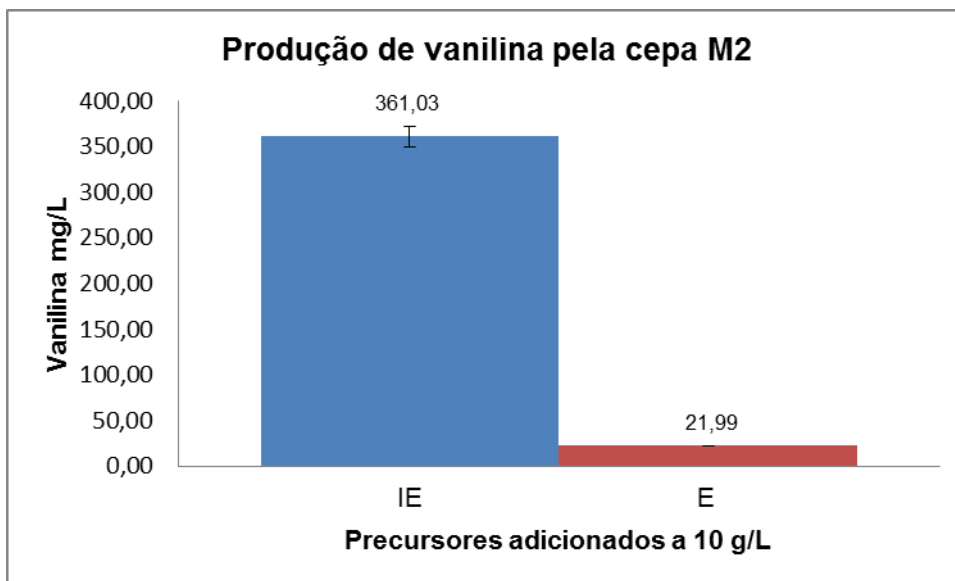


Gráfico 4.21 – Produção de vanilina pela cepa M2 com adição dos precursores isoeugenol (IE) e eugenol (E) na concentração de 10 g/L e tempo de fermentação de 96 h.

A cepa M2 por sua vez alcançou 3,61 % e 0,22 % de bioconversão em vanilina a partir do isoeugenol e eugenol, respectivamente.

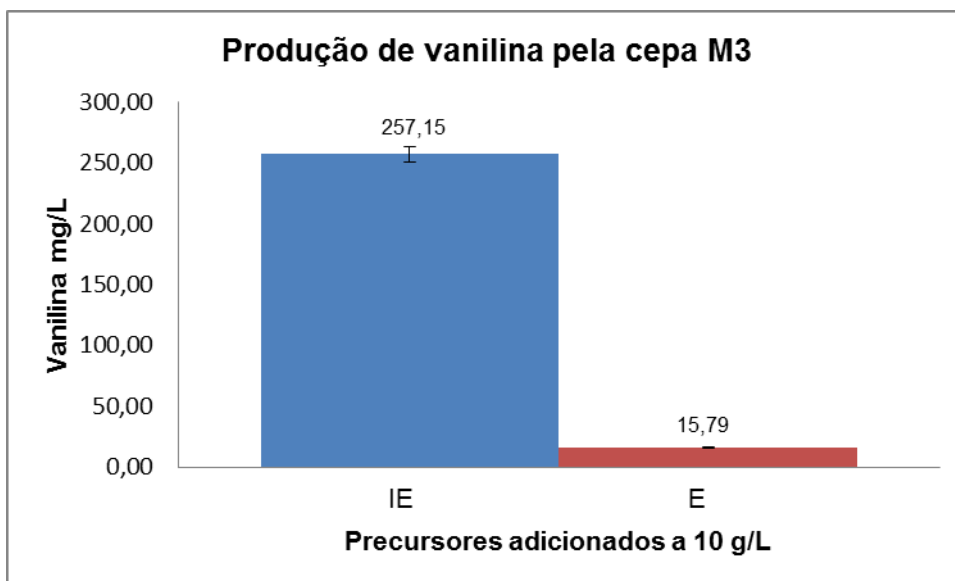


Gráfico 4.22 – Produção de vanilina pela cepa M3 com adição dos precursores isoeugenol (IE) e eugenol (E) na concentração de 10 g/L e tempo de fermentação de 96 h.

Para a cepa M3 obteve-se um total de 2,57 % de bioconversão de isoeugenol a vanilina e 0,16 % de bioconversão de eugenol a vanilina. Estes resultados foram obtidos utilizando apenas as condições de cultivo estabelecidas para *B subtilis* MLPB, ou seja, sem nenhuma otimização.

Pode-se observar a partir destes resultados, que entre as cepas isoladas, a M2 apresenta os resultados mais próximos aos da *A. orientalis* (440,62 mg/L) para a produção de vanilina a partir de eugenol e isoeugenol.

3.9 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VANILINA E BIOCONVERSÃO DO ISOEUGENOL EM CONCENTRAÇÕES DE 1 A 10 g/L PELA CEPA ISOLADA M2

Os resultados observados da produção de vanilina pela cepa M2 a partir de isoeugenol sugerem que a produção de vanilina em termos de concentração no meio está fortemente relacionada ao aumento de concentração de precursor no meio, de maneira favorável. (Gráfico 4.23).

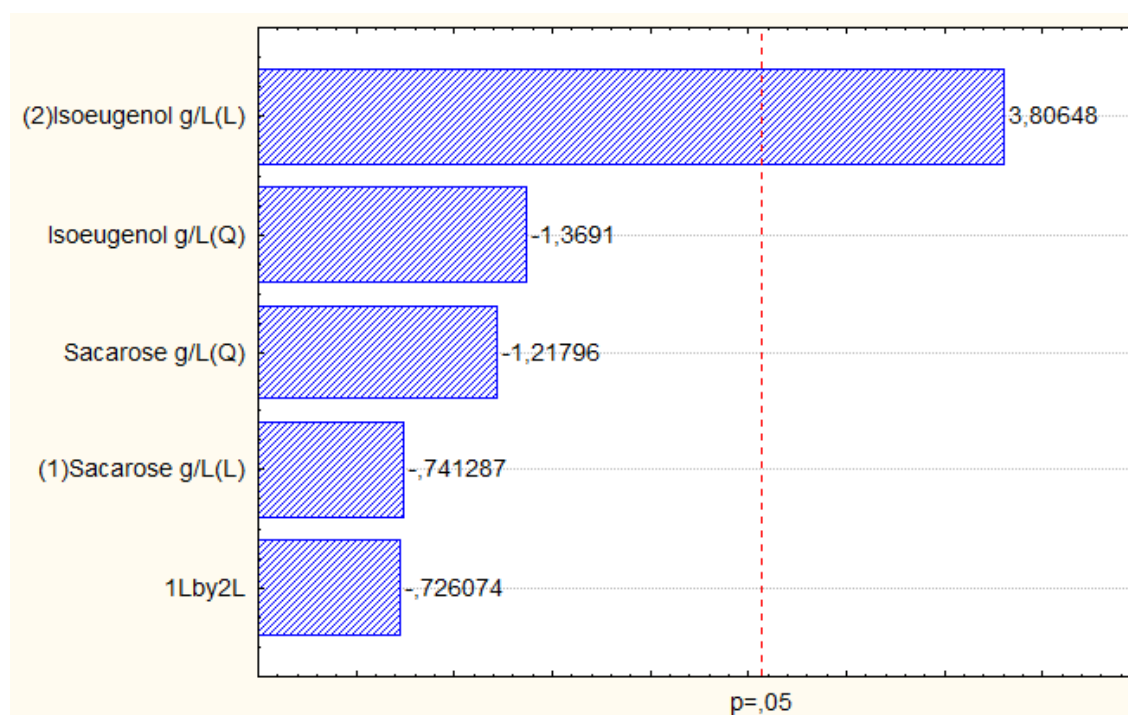


Gráfico 4.23 – Pareto mostrando o efeito positivo significativo da concentração do precursor isoeugenol sobre a concentração de vanilina produzida pela cepa M2.

Contudo quando analisamos a quantidade de vanilina produzida em relação à concentração do precursor adicionado no meio podemos ver claramente que a bioconversão foi melhor quando foi adicionado 1 g/L de isoeugenol ao meio (15,69% (g/g)), com uma produção máxima de vanilina de 156,89 mg/L. Quando comparada com as condições onde foram utilizadas concentrações maiores de isoeugenol 5,5 g/L

com 10,07%; 8,7 g/L com 5,92% e 10,5 g/L com 3,77% no caso da bioconversão e menores quando nos referimos a produção total de vanilina que foram de 596,88 mg/L, 514,82 mg/L e 377,5 mg/L de vanilina respectivamente, nos mesmos testes (Gráfico 4.24). O gráfico 4.24 mostra que a relação entre o aumento da bioconversão é inversamente proporcional ao aumento da concentração de precursor adicionado no meio, dentro das condições estudadas aqui.

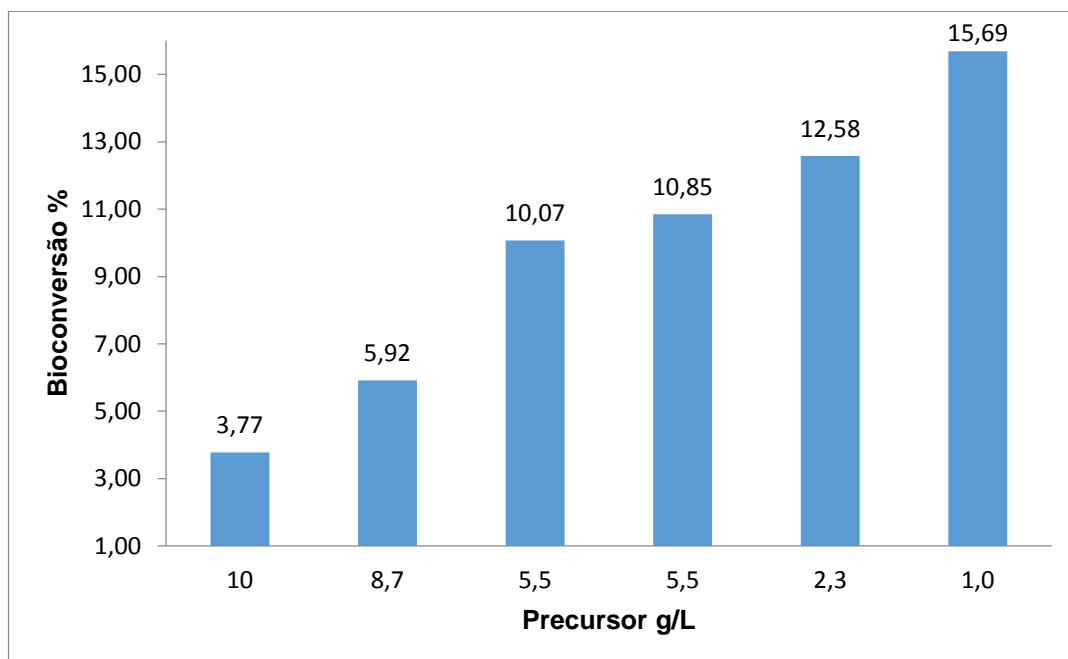


Gráfico 4.24 – Bioconversão de isoeugenol pela cepa M2 durante 120 horas de fermentação.

Com relação à produção de vanilina e à concentração de sacarose no meio, obteve-se as duas maiores concentração (596,88 mg/L e 553,98 mg/L), nas condições onde foram colocados 10,5 g/L e 1g/L de sacarose. Estes resultados confirmam que para a cepa M2, nestas condições não é a concentração de açúcar no meio, mas a do isoeugenol que interfere na produção de vanilina.

Os melhores resultados de eficiência molar nos estudos de produção de vanilina a partir de 10 g/L de isoeugenol foram obtidos para a cepa *A. orientalis* com 5,04 % de conversão. Estes resultados estão abaixo dos que Ashengroph *et al.*, (2012) encontraram em seus estudos com *Psychrobacter sp.* Strain CSW4, durante trabalhos de otimização de um processo de produção de vanilina, uma eficiência molar de 16,4 % (141,45 mg/L de vanilina com 1 g/L de isoeugenol). Porém, quando estes autores utilizaram a concentração de 10 g/L de isoeugenol conseguiram uma produção máxima de 1,28 g/L o que representa uma menor eficiência molar 12,8%. Os autores

atribuíram a menor taxa de bioconversão a grande concentração do substrato ou ao aumento da concentração do produto. Em nossos estudos conseguiu-se resultados idênticos aos de Ashengroph *et al.*, (2012) quando adicionou-se no meio de cultivo uma concentração inicial de 1,0 g/L de isoeugenol e atingiu-se 157 mg/L de vanilina, neste caso a eficiência molar foi de 16,91%. Além disso, observou-se que há de fato uma relação inversamente proporcional entre a concentração do precursor e a eficiência molar na bioconversão de isoeugenol a vanilina para esta bactéria (M2) nestas condições (Tabela 4.9). Nos resultados de Ashengroph *et al.* (2011) com *Pseudomonas resinovorans* SPR1 a produção foi de 79 mg/L de vanilina a partir da biotransformação do eugenol. Os autores relatam como uma eficiência de 9%, abaixo dos resultados que obtivemos com a cepa M2. O mesmo pode ser dito com relação aos resultados de Shimoni *et al.* (2000) 0,6 g/L que utilizaram *Bacillus* sp para produzir vanilina a partir de isoeugenol e obtiveram uma eficiência molar de 12,4%.

Gioia *et al.* (2011) também observaram, quando estudaram a produção de vanilina por *Pseudomonas fluorescens* engenheirada uma diminuição em 98% da eficiência de conversão de ácido ferúlico a vanilina pelo microrganismo quando aumentaram a concentração do precursor de 10 mM para 20 mM. Ashengroph *et al.* (2011) também analisaram o efeito das concentrações de eugenol no meio para a produção de vanilina por *Pseudomonas resinovorans* SPR1 e encontraram que para as concentrações testadas de 1 e 2,5 g/L de eugenol houve um aumento proporcional da eficiência molar, porém para os valores maiores com 5 e 7,5 g/L a eficiência molar foi diminuída. Estes autores atribuíram estes efeitos a toxicidade do eugenol. No nosso caso conseguiu-se uma eficiência molar de 6,38% com 52,98 mM (8,7 g/L) de isoeugenol e de 16,91% com adição de 6,09 mM (1 g/L) de isoeugenol para a cepa M2, ou seja, quando usamos 1g/L de precursor tivemos um aumento de mais de 2,7 vezes na eficiência molar com relação a concentração de 8,7 g/L (Tabela 4.10). No caso da cepa M2, a eficiência molar foi de 11,7% para a fermentação com isoeugenol com 5,5 g/L quando comparada com a apresentada por Ashengroph *et al.* (2011) em sua melhor concentração utilizando 2,5 g/L de eugenol.

Tabela 4.9 – Comparação entre a produção de vanilina e eficiência das cepas M1, M2 e M3 com algumas relatadas pela literatura.

Referência	Cepa	Vanilina	Precusores	Eficiência molar
	<i>B. subtilis</i>	0,22 g/L	10 g/L (Isoeugenol)	2,37%
	<i>A. orientalis</i>	0,47 g/L	10 g/L (Isoeugenol)	5,04%
	M1	0,13 g/L	10 g/L (Isoeugenol)	1,25%
	M2	0,16 g/L	1 g/L (Isoeugenol)	16,9%
	M3	0,26 g/L	10 g/L (Isoeugenol)	2,82%
Ashengroph et al., (2012)	<i>Psychrobacter</i> sp. Strain CSW4	0,14 g/L	1 g/L (Isoeugenol)	16,4%
Ashengroph et al. (2011)	<i>Pseudomonas resinovorans</i> SPR1	0,24 g/L	2,5 g/L (eugenol)	10%
Zhang et al. (2006)	<i>Bacillus subtilis</i> HS8	1,36 g/L	10 g/L (ácido ferúlico)	14,66%
Rabenhorst et al. (2003)	<i>Amycolatopsis</i> sp. HR167	11.5 g/L	19.92 g/L (ácido ferúlico)	77,8%

Tabela 4.10 – Relação entre a eficiência molar e a concentração inicial do isoeugenol no meio de cultivo para a cepa isolada M2 considerando os melhores índices de produção.

Concentração precursor g/L	Produção máxima de vanilina g/L	Eficiência molar %
1,0	0,157	16,9
2,3	0,289	13,5
5,5	0,597	11,7
8,7	0,515	6,38

4 CONCLUSÕES

O *Bacillus subtilis* MLPB apresentou capacidade de crescimento apenas na presença de isoeugenol.

Amycolatopsis orientalis obteve melhor crescimento na presença de isoeugenol nas concentrações de 1,0 a 5,0 g/L e não foi capaz de crescer no meio com vanilina a 5,0 g/L.

Amycolatopsis orientalis apresentou a melhor produção média utilizando isoeugenol como precursor com acumulo de 9,790 mg/L de vanilina taxa de bioconversão 6,527%.

O aumento da concentração de glicose favorece a produção de vanilina via ácido ferúlico e eugenol por *A. orientalis*;

Há a necessidade de estudos para determinar com maior precisão as melhores condições para a utilização do isoeugenol precursor nos processos de produção de vanilina por via microbiana.

Houve uma diminuição considerável na taxa da bioconversão máxima por *A. orientalis* quando os precursores foram adicionados na concentração de 10 g/L (isoeugenol de 6,527% para 4,41 %).

As cepas isoladas M1, M2 e M3 obtiveram crescimento próximo aos de *A. orientalis* para o isoeugenol e apresentaram as melhores produções de biomassa nos testes realizados para a vanilina inclusive na concentração de 5 g/L e para o ácido ferúlico e eugenol.

As cepas M1, M2 e M3 foram capazes de bioconverter todos os precursores estudados neste trabalho, porém os melhores valores foram para o isoeugenol nos três casos. A máxima produção de vanilina foi de 125,66 mg/L para a cepa M1 com média de 122,58 mg/L \pm 2,74 e taxa de bioconversão de 1,22 %; 372,9 mg/L e produção média de 361,03 mg/L \pm 11,3 e bioconversão de 3,61 % para M2 e 262,61 mg/L com média de 257,15 mg/L \pm 6,58 e bioconversão de 2,57 % para M3.

A cepa M2 apresentou maior bioconversão (15,69%) de isoeugenol a vanilina com 1 g/L deste precursor no meio.

Embora neste trabalho não represente o um dos melhores processos produção de vanilina. Pode-se chegar a alguma produção desta molécula por fermentação microbiana, com a utilização dos precursores eugenol, ácido ferúlico e isoeugenol. Além de se determinar algumas questões que serviram de parâmetros para estudos futuros.

O cultivo de células de *Vanilla planifolia*, esbarrou em algumas dificuldades que devem ser resolvidas em estudos futuros, visto que este se faz uma importante ferramenta para o entendimento e a desenvolvimento de alternativas para os processos de produção de vanilina por via microbiana.

Para os futuros estudos sobre cultivo de tecido e células vegetais, recomenda-se a testar concentrações diferentes, de reguladores de crescimento vegetal, daquelas empregadas neste trabalho e também das descritas na literatura. Além disso deve-se investigar fontes alternativas de tais compostos.

As análises da presença de vanilina em soluções e/ou caldos fermentados, foi realizada, qualitativamente, por espectrofotometria e houve boa correlação, em todas as repetições, entre as concentrações desta molécula em soluções padrões e os resultados obtidos a partir da utilização do método e entre estes e aqueles obtidos a partir da leitura em HPLC. Desta forma podemos sugerir um método colorimétrico para detecção de vanilina em determinadas soluções.

Apesar de ser possível a verificação da presença de vanilina em fermentados, há a necessidade de mais estudos a fim de confirmar a precisão e confiabilidade do método aqui apresentado.

Ficou evidente que o isoeugenol é o melhor precursor, dentre os estudados aqui, para utilização nos processos de produção de vanilina. Sendo que ele apresentou menor toxicidade para as células e que houve uma maior bioconversão do mesmo à vanilina, pelos microrganismos.

As concentrações de isoeugenol próximas a 1 g/L foram as mais adequadas para obter um melhor rendimento em eficiência molar. Contudo há a necessidade de estabelecer com mais exatidão a concentração ideal deste precursor, a fim de obter o máximo rendimento no processo.

O crescimento da biomassa durante um período de 12 horas antes da adição do precursor foi importante para garantir a maior produção de vanilina a partir de qualquer um dos precursores testados (eugenol, ácido ferúlico e isoeugenol).

Cepas microbianas isoladas do ambiente foram capazes de converter os precursores eugenol, ácido ferúlico e isoeugenol em vanilina, contudo trabalhos de seleção e melhoramento genético devem ser conduzidos, a fim de melhorar a eficiência das cepas já isoladas e aqui estudadas. Porém é interessante a realização de novos trabalhos de isolamento e seleção de novas cepas.

REFERÊNCIAS

- ACCORSINI, F. R. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Jaboticabal 77 p. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010.
- ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHONI, H.; MOMENBEIK, F. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potencial of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. **New Biotechnology**. Vol. 28, nº 6, 2011.
- ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. *Candida galli* strain PG06: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanilic acid. **Current Microbiol.** Vol. 62, p. 900-908, 2011(a).
- ASHENGROPH, M.; NAHVI, M.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. Use of Growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol. **Iranian Journal of Pharmaceutical research**. Vol. 10, nº4, p. 749-757, 2011(b).
- ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. Conversion of Isoeugenol to Vanillin by Psychrobacter sp. Strain CSW4. **Appl Biochem Biotechnol.** Vol. 166, p. 1 – 12, 2012.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Belo Horizonte, 206 p. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.
- CONVERTI, A.; ALIAKBARIAN, B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; VÁZQUEZ, G. B.; PEREGO, P. Microbial production of biovanillin. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 41, p. 519-530, 2010.
- DOFFI, A. S.; ARANTES, E. J.; CARVALHO, H. A.; HATORRI, A.Y. **Monitoramento de bactérias nitrificantes e desnitrificantes em reator aeróbio de batelada intermitente**. XIV SICITE, Vol. 2, Campo Mourão, 2010.
- FLEIGE, C.; HANSEN, G.; KROLL, J.; STEINBÜCHEL, A. Investigation of the Amycolatopsis sp. Strain ATCC 39116 Vanillin Dehydrogenase and Its Impact on the Biotechnical Production of Vanillin. **Appl. Environ. Microbiol.** Vol. 79, nº1, p. 81 - 90, 2013.
- GASSON, M. J.; KITAMURA, Y.; MCLAUCHLAN, W. R.; NARBAD, A.; PARR, A. J.; PARSON, E. L. H.; PAYNE, J.; RHODES, M. J. C.; WLATON, N. J. Metabolismo of ferulic acid to vanillin. **Journal of Biological Chemistry**. Vol. 273, nº 7, p. 4163-4170, 1998.
- GIOIA, D. D.; LUZIATELLI, F.; NEGRONI, A.; FICCA, A. G.; FAVA, F.; RUZZI, M. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. **Journal of Biotechnology**, vol. 156, p. 309-316, 2012.

GONÇALVES, D. M.; FRANCISCO, N. S.; COELHO, M. A.; FRANCO, J. M. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Vol. 13, nº2, p. 197-202, Botucatu, 2011.

GURUJEYALAKSHMI, G.; MAHADEVAN, A. Dissmilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*. **Current microbiology**. Vol. 16, p. 69-73, 1987.

JÚNIOR, P. I. F. **Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [(*Caján cajan* (L.) Millsp.)]**. Tese (Doutorado em Agronomia) Seropédica 166 p. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

KAUR, B.; CHAKRABORTY, D. Biotechnological and Molecular Approaches for Vanillin Production: a Review. **Appl Biochem Biotechnol**. Vol. 169, p. 1353–1372, 2013.

KAUR, B.; CHAKRABORTY, D.; KUMAR, B. Metabolic engineering of *Pediococcus acidilactici* BD16 for production of vanillin through ferulic acid catabolic pathway and process optimization using response surface methodology. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2014.

LANE, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In*: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. editors. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York, NY: John Wiley and Sons, 1991, p.115-175.

LI, X.; YANG, J.; LI, X.; GU, W.; HUANG, J.; ZHANG, K.-Q. The metbolism of ferulic acid via 4-vinylguaicol to vanillin by *Enterobacter* sp Px6-4 isolated from *Vanilla* root. **Process Biochemistry**. Vol. 43, p. 1132-1137, 2008.

MA, Xiao-kui; DAUGULIS, A. J. Transformation of Ferulic Acid to Vanillin Using a Fed-Batch Solid–Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor. **Biotechnol. Prog.** Vol. 30, nº 1, 2014.

MUHEIN, A.; MÜLLER, B.; MUNCH, T.; WETLI, M. **Microbiology process for producing vanillin**. United State Patent. Pat. nº US 6,235,507 B1, 22 de maio de 2001.

NIKEL, P. I.; PETTINARI, M. J.; MÉNDEZ, B. S.; GALVAGNO, M. A. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. **International Microbiology**. Vol. 8, p. 243-250, 2005.

ODOUX, E.; CHAUWIN, A.; BRILLOUET, J.M. Purification and carактерization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -D-Glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 51, p. 3168-3173, 2003.

ODOUX, E. ESCOUT, J.; VERDEILE, J.-L. The relation between glucovanilin, β -D-glucosidase activity and celular comportmentation during the senescence, freezing and traditonal curing of vanilla beans. **Annals of Applied Biology**, 2006.

OLIVEIRA, N. C. **Seleção de microrganismos endofíticos com potencial para a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo**

e ou derivados. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) Goiânia 85 p. Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2009.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 18, nº2, p. 301-307, 2008.

OVERHAGE, J.; PRIEFERT, H.; RABENSHOUST, J.; STEINBÜCHEL, A. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutante of *Pseudomonas* sp strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*Vdh*) gene. **Applied Microbiol Biotechnol**. Vol. 52, p. 820-828, 1999.

OVERHAGE, J.; STEMBUCHEL, A.; PRIEFERT, H.; Harnessing eugenol as a substrate for production of aromatic compounds with recombinant strains of *Amycolatopsis* sp. HR167. **Journal of Biotechnology**, Vol. 125, p. 369-376, 2006.

PAGNOCELLI, M.; SOCCOL, C. R.; SANTOS, M. C. P. **Isolamento e identificação de bactérias lácticas da microflora da polpa de café cereja.** Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2001.

PLAGGENBORG, R.; OVERHAGE, J.; LOOS, A.; ARCHER, J. A. C.; LESSARD, P.; SIMSKEY, A. J.; STEINBÜCHEL, A.; PRIEFERT, H. Potencial *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from acid ferulic and eugenol. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**. Vol. 72, p. 745-755, 2006.

RABENHORST, J.; STEINBUCHEL, A.; PRIEFERT, H.; ACHTERHOLT, S. **Enzyme and genes used for producing vanilin.** United States Patent Application Publication. Pub. nº US 2003/00921143 A1, May 15, 2003.

RAGGI, L. **Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Meio Ambiente). São Paulo 67 p. Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente. São Paulo, 2008.

RODRIGUES, J. **Vanilina – Molécula da Semana.** 2012. FCIência. Disponível em: <http://www.fciencias.com/2012/12/06/molecula-da-semana-vanilina/>. Acesso em 10/10/2014.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, NY: Cold Spring Harbor, 1989.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Vol. 11, nº 4, p. 442-449, 2009.

SHIMONI, E.; RAVID, U.; SHOLAM, Y. Isolation of a *Bacillus* sp capable of trnsforming isoeugenol to vanillin. **Journal of Biotechnology**. Vol 78, p. 1-9, 2000.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILBVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: Isolamento, caracterização enzimática e promoção do

crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasileira**. Vol. 20, nº 3, p. 649-655, 2006.

STEPHENSON, F. H. **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology**. A Guide to Mathematics in the Laboratory. 2e. Boston: Academic Press, 2010.

VOSS, G. B. **Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoides de galhas do tomateiro**. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 113 p., 2013.

YOON, S.-H.; LI, C.; KIN, J.-E.; LEE, S.-H.; YOON, J.-Y.; CHOI, M.-S.; SEO, W.-T.; YANG, J.-K.; KIN, J.-Y.; KIN, S.-W. Production of vanillin by metabolic engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**. Vol. 27, p. 1829-1832, 2005.

WALTON, N.; MAUER, M. J.; NARBAD, A. **Molecules of interest vanillin**. **Phytochemistry**, vol. 63, p. 505-515, 2003.

ZHANG, Y.; XU, P.; HAN, S.; YAN, H.; MA, C.; Metabolismo f isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. **Applied Microbiol Biotechnology**. Vol. 73, p. 771-779, 2006.